



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**EVALUACIÓN DE ALGUNAS REGIONES DEL ADNmt PARA ANALIZAR
RELACIONES FILOGENÉTICAS Y VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Cynomys
mexicanus* Y *Spermophilus spilosoma* (RODENTIA: SCIURIDAE)**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología

PRESENTA

LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO

TUTORES: **Dr. Ricardo López Wilchis**
 Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa

ASESOR: **Dr. Francisco Flores Pedroche**

Enero 2004



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

IDÓNEA COMUNICACION DE RESULTADOS

EVALUACION DE ALGUNAS REGIONES DEL ADNmt PARA ANALIZAR RELACIONES FILOGENETICAS Y VARIABILIDAD GENETICA EN *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma* (RODENTIA: SCIURIDAE)

En México, D.F. se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de ENERO del año 2004 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DR. RICARDO LOPEZ WILCHIS;
DRA. IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA;
DR. ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO;
DR. MIGUEL ANGEL ARMELLA VILLALPANDO Y
DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de Resultados para la obtención del Grado de Maestro en:

BIOLOGIA

LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO

presentó una comunicación de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

Aprobarlo

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO FIRMA DEL INTERESADO

REVISO

LUJÁN FLORES FABREGAT
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
DIRECCION DE REVISION

PRESIDENTE

DR. RICARDO LOPEZ WILCHIS

VOCAL

DRA. IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA

VOCAL

DR. ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO

VOCAL

DR. MIGUEL ANGEL ARMELLA VILLALPANDO

SECRETARIO

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

Dedicatoria

A Dios, a mis padres y a mis hermanos

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo López-Wilchis por la dirección, apoyo y sabios consejos durante la realización del presente trabajo.

A la Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa por la dirección, enseñanzas, respaldo y por sus objetivas y acertadas críticas que me permitieron el logro de la tesis.

Al Dr. Francisco Flores Pedroche, por su colaboración y asesoría brindada, la cual fue fundamental para la conclusión de esta obra.

A los miembros del jurado externo, el Dr. Francisco Javier García de León y el Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco, quienes revisaron, corrigieron y aportaron puntos valiosos que enriquecieron favorablemente la presentación final de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que me brindó el apoyo económico durante el tiempo de desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Hielen Lacey y al Dr. Eduardo Medinilla por proporcionar los cebadores para efectuar este trabajo.

Al Biól. Alejandro Soto Castruita, a la MVZ Rosa María Aguilar y al M. en B. R. Miguel León, compañeros y amigos, quienes me apoyaron durante el trabajo de campo y con quienes aprendí que la naturaleza puede ser impredecible.

A mis compañeros Abel Chihuahua, Jair Guzmán y Miguel Ángel Ordoñez, por el apoyo brindado, pero hago especial énfasis a mi amigo Ángel Pérez Zavaleta, por su confianza y compañerismo incondicional.

A las personas, que en su momento, me apoyaron y me dieron ánimos para llevar a término este trabajo.

ÍNDICE DE SIGLAS

ADNmt:	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
CD:	Central domain
CSB:	Conserved sequence block
D-Loop:	Displacement-Loop
ETAS:	Extended termination-associated sequence
Nt:	Nucleótidos
PAUP	Phylogenetic analysis using parsimony
Pb	Pares de bases
PCR:	Polymerase chain reaction

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
<hr/>	
2. ABSTRACT	3
<hr/>	
3. INTRODUCCIÓN	5
<hr/>	
4. MARCO TEÓRICO	6
<hr/>	
5. ANTECEDENTES	15
<hr/>	
6. JUSTIFICACIÓN	33
<hr/>	
7. HIPÓTESIS	34
<hr/>	
8. OBJETIVOS	35
<hr/>	
9. ÁREA DE ESTUDIO	36
<hr/>	
10. MATERIAL Y MÉTODOS	38
<hr/>	
11. RESULTADOS	48
<hr/>	
12. DISCUSIÓN	78
<hr/>	
13. CONCLUSIONES	92
<hr/>	
14. LITERATURA CITADA	95
<hr/>	
15. ANEXOS	110

1. RESUMEN

En el presente estudio se analizaron las regiones mitocondriales: región control [D-Loop], genes citocromo b y ARNr 16S, en los roedores *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma*, con el objetivo de determinar el aporte informativo de los mismos a nivel de variabilidad genética e inferencia filogenética. La estrategia metodológica incluyó el análisis de secuenciación, caracterización, inferencia filogenética y restricción enzimática, de dichos genes en las especies mencionadas, así como del análisis de secuencias de los mismos genes depositadas en el GenBank para diversas especies de ambos géneros. Los datos de secuenciación obtenidos para el gen citocromo b fueron de 713 pares de bases (237 aminoácidos), que corresponden al 62.5% del total del gen. Para la región control fueron 1063-64 pares de bases e indican que la región esta conformada por tres dominios principales (ETAS, extension termination associated sequences; CD, central domain; y CSB, conserve sequencing block). En ambas regiones el número de transiciones fue mayor que el de transversiones tanto a nivel intra-específico como a nivel inter-genérico. Se detecta una baja divergencia intra-específica para *C. mexicanus* en el gen citocromo b (0.0 - 0.14%) y nula para la región control. Mientras que en *S. spilosoma*, se detecta una divergencia de 0.3%-0.98% en el gen citocromo b (0.004% a nivel de aminoácidos), y de 0.3 - 0.4% en la región control. La divergencia nucleotídica inter-genérica (*C. mexicanus* - *S. spilosoma*) fue mayor, 8.0 - 9.3% en el gen citocromo b (3.4 - 3.8% a nivel de aminoácidos) y 2.2 - 16.1 % en la región control. La divergencia a nivel inter-específico fue mayor entre las especies *S. spilosoma* - *S. washingtoni* (11.6%) y *S. spilosoma* - *S. madrensis* (15.0%), que entre *S. washingtoni* y *S. madrensis* con respecto a *C. mexicanus* (10.9% y 14.4%, respectivamente). Los cladogramas generados empleando únicamente a las especies objeto del presente estudio y por medio del análisis de distancia, parsimonia y máxima probabilidad, con el gen citocromo b y la región control, muestran a *C. mexicanus* y *S. spilosoma* como grupos monofiléticos. Sin embargo, cuando se utilizan secuencias adicionales del gen citocromo b, los resultados sugieren dos hipótesis, por un lado, el origen parafilético de las especies del género *Spermophilus* (*S. mexicanus*, *S. tereticaudus* y *S. spilosoma*) con relación al género *Cynomys*,

y por otro lado el origen polifilético del género *Spermophilus*, basado en los caracteres convergentes que presenta el mismo. Finalmente, el análisis de restricción enzimática con la enzima Rsa I para los tres genes mostró dos diferentes haplotipos a nivel inter-genérico, pero no detectó diferencias a nivel intra-específico. Sin embargo, el análisis de las secuencias de la región control y del gen citocromo b por medio de la simulación de restricción con las enzimas Fat I, Nla III, BfuC I, Dpn I, Mbo I y Sau3 AI, Taq I, para el primero y de las enzimas Alu I, HpyCH4 V, Rsa I, Bfa I, BfuC I, Dpn I y Sau3 AI, para el segundo, sugieren la presencia de diferentes haplotipos a nivel intra-específico, por lo que se sugiere la utilización de dichas enzimas para evaluar la diversidad genética de ambas especies.

2. ABSTRACT

This study shows the analyses of the mitochondrial regions: control region [D-Loop], the cytochrome b gene and the ARNr 16S gene in the rodents *Cynomys mexicanus* and *Spermophilus spilosoma*, with the aim to determine their relevance for studies of genetic variation and phylogenetic inferences. The methodological strategy included, sequencing analysis, gene characterization, phylogenetic inferences and restriction analysis in the species mentioned above, sequencing analysis of the same genes for related species deposited in the GenBank were also carried out. The sequencing data obtained for the cytochrome b gene were 713 base pairs (237 amino acids), which correspond to 62.5% of the entire gen. For the D-Loop were 1063-64 base pairs, which showed that this region is structures by three domains (ETAS, extension termination associated secuencias; CD, central domain; and CSB, conserve sequencing block). Both regions showed a higher transition to transversion ratio at the intra-specific and inter-generic levels. A low intra-specific divergence is observed in the *C. mexicanus* cytochrome b gene (0.0 - 0.14%) and zero divergence is observed for the D-Loop region. Whereas for *S. spilosoma* a 0.3% - 0.98% divergence was observed in the cytochrome b gene (0.004% at the amino acids level), and 0.3 - 0.4% in the D-Loop region. The inter-generic (*C. mexicanus* - *S. spilosoma*) nucleotide divergence was higher, 8.0 - 9.3% in the cytochrome b gene (3.4 - 3.8% at the amino acid level), and 2.2 - 16.1% in the D-Loop region. At the inter-specific level a higher nucleotide divergence was observed between *S. spilosoma* - *S. washingtoni* (11.6%) and *S. spilodoma* - *S. madrensis* (15.0%) than between *S. washingtoni* and *S. madrensis* in relation to *C. mexicanus* (10.9% and 14.4%, respectively). The cladograms generated using only the species of this study and utilizing distance analysis, parsimony and maximum probability and with both, the cytochrome b gene and the control region, resolve *C. mexicanus* and *S. spilosoma* as monophyletic groups. However, when additional sequences of the cytochrome b gene from other species of both genera are utilized the results drive us to two hypothesis, one suggesting a paraphyletic origin in the species of the genus *Spermophilus* (*S. mexicanus*, *S. tereticaudus* and *S. spilosoma*) in relation to the

species of the genus *Cynomys*, and a second hypothesis that suggest paraphyly for the genus *Spermophilus*. Finally, the restriction enzyme analysis with Rsa I in the three mitochondrial regions showed two different haplotypes at the inter-generic level, and did not resolved differences at the intra-specific level. Furthermore, the sequencing analysis of the D-Loop and cytochrome b regions by means of simulated restriction digest with the enzymes Fat I, Nla III, BfuC I, Dpn I, Mbo I and Sau3 AI, Taq I, for the first one and Alu I, HpyCH4 V, Rsa I, Bfa I, BfuC I, Dpn I and Sau3 AI, for the second one, suggest the presence of different haplotypes at the intra-specific level, and led us to suggest the use of them to evaluate genetic diversity.

3. INTRODUCCIÓN

El perrito mexicano de las praderas, *Cynomys mexicanus* Merriam, 1892, es un mamífero endémico y nativo de nuestro país cuya situación actual es inestable y su futuro es incierto debido a la disminución drástica de sus poblaciones naturales. Esta catalogada como una especie en peligro de extinción por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES, 2001). Por su parte, la ardilla de tierra, *Spermophilus spilosoma* Bennett, 1833, es una especie que coexiste con el perrito de las praderas, al menos en las localidades de los estados de San Luis Potosí y Coahuila. Actualmente las localidades donde se encuentran estas especies se ubican totalmente aisladas una de otra (más de 10 km entre las localidades más cercanas) y, tomando en cuenta su peculiar forma de vida, el flujo genético intra-específico entre ellas parece ser nulo, de ahí que quepa la posibilidad de que ambas especies estén experimentando un proceso de evolución similar, sin embargo hasta el momento existen muy pocos estudios que se enfoquen en la filogenia de éstas especies.

En los últimos años el uso de herramientas moleculares, como el ADNmt, han venido representando una herramienta más para dilucidar aspectos de variabilidad genética intra e inter-específica y de relaciones filogenéticas (Albert *et al.*, 1994; Dodgson *et al.*, 1997); dentro del grupo de los roedores se han utilizado ampliamente (Tagliaro *et al.*, 1997; Smith y Patton, 1999; Oscida y Masuda, 2000; Spradling *et al.*, 2001). Sin embargo, en este sentido, hasta el momento poco es lo que se ha realizado dentro de las especies de la familia Sciuridae (Herron *et al.*, en prensa). Por ello, en el presente estudio se llevó a cabo la evaluación de algunas regiones del ADNmt (la región control, el gen citocromo b y el gen ARNr 16S), para observar su importancia en la determinación de niveles de variabilidad genética, así como para dilucidar las relaciones filogenéticas de las dos especies de la familia Sciuridae, el perrito mexicano de las praderas (*C. mexicanus*) y la ardilla de tierra manchada (*S. spilosoma*).

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Sistemática Filogenética

La sistemática filogenética, ahora frecuentemente referida como “cladística”, “cladismo”, “Hennigismo” o “Método Hennigiano”, fue introducida entre los biólogos por el entomólogo alemán Willi Hennig en 1950. La meta de Hennig fue la elaboración de un método objetivo para la reconstrucción de filogenias (genealogías de los organismos) y el establecimiento de clasificaciones que reflejen dichas filogenias. Su método fue una respuesta al hábito generalizado entre los biólogos y paleontólogos de clasificar a los organismos sobre la base de criterios heterogéneos (morfológicos, etológicos, etc.) (Wiley, 1981).

En su sentido original, como Hennig la definió, la Sistemática Filogenética descansa en el postulado de una descendencia con evolución en el sentido moderno. Por lo tanto, los caracteres observados en cualquier organismo pueden mostrar un estado primitivo o uno avanzado (derivado). Algunos cladistas rechazan este postulado evolutivo, considerándolo innecesario. Esta nueva forma de la Cladística, frecuentemente denominada como Cladística Transformada, es difícil de entender por los biólogos entregados a la tradición evolutiva, y es algunas veces erróneamente considerada como un creacionismo científico. El fundamento de la Sistemática Filogenética de Hennig es que las similitudes de los organismos no siempre tienen el mismo significado o apariencia en las relaciones entre estos. Los organismos o grupos de organismos se asemejan unos a otros porque comparten caracteres avanzados o primitivos. Hennig llamó a los avanzados (o derivados) caracteres apomórficos y a los primitivos, caracteres plesiomórficos (Wiley, 1981; Forey *et al.*, 1992).

Los caracteres derivados compartidos se denominan sinapomorfias. Hennig considera que las sinapomorfias solas indican relaciones entre organismos, y que todos los organismos que comparten una sinapomorfia forman un grupo monofilético. Una sinapomorfia puede desaparecer secundariamente o empezar a modificarse dentro de un grupo monofilético que la

define; la ontogenia o convergencias con otras sinapomorfias revelan, frecuentemente, aquellos casos de reversión. Un taxón o grupo monofilético incluye una especie ancestral común y todas las especies que descienden de ella y es reconocido por al menos una apomorfía que aparece en el ancestro común. Una sinapomorfía puede ser un carácter homólogo, que es un carácter heredado de un ancestro común.

Las simplesiomorfias, o caracteres primitivos, compartidas indican un ancestro común, pero no inmediato y exclusivo. Los grupos de taxa definidos por simplesiomorfias fueron llamados parafiléticos por Hennig. Finalmente se puede hacer un agrupamiento sobre la base de caracteres no homólogos, llamados caracteres convergentes, dichos grupos o taxa son polifiléticos. (Forey *et al.*, 1992).

Dentro de estos tres tipos de grupos (monofilético, parafilético y polifilético) Hennig considera que los grupos monofiléticos son los únicos que realmente tienen relevancia filogenética, debido a que ellos tienen historia propia. En contraste, los grupos parafiléticos no tienen historia propia, o esta es parte también de la de los grupos monofiléticos enraizados en ellos. Lo mismo ocurre con los grupos polifiléticos. Este se considera un punto fundamental en los principios de Hennig: la transformación de una filogenia a una clasificación. La historia de un grupo monofilético es una serie de eventos únicos y no puede ser modificada por eventos subsecuentes. Lo que puede ser modificado es la reconstrucción de esa historia por parte de los filogenetistas (Wiley, 1981).

4.1.1 Reconstrucción de filogenias

La reconstrucción filogenética se sustenta en el concepto darwiniano de "descendencia con modificación", de forma que los caracteres que se observan en las distintas especies, heredados a partir de un ancestro común, son indicativos de una relación genealógica. El postulado del que se parte es que la semejanza puede ser interpretada de forma racional bajo la óptica de una ascendencia común. El problema, por tanto, que plantea la reconstrucción

filogenética es el de la inferencia del ancestro a partir de la observación de los caracteres que presentan los taxa terminales (López-Caballero y Pérez Suárez, 1999).

Dos especies o grupos de especies más estrechamente relacionadas una a otra que a cualquier otra especie, en una clasificación filogenética, son llamadas especies hermanas o grupos hermanos, y poseen un mismo rango taxonómico, aunque, sin embargo, muchos de ellos difieran en divergencia o importancia en número de especies (Forey *et al.*, 1992).

Hennig propuso un criterio para establecer el estado de los caracteres (apomórficos y plesiomórficos), conocido actualmente como el grupo externo (out-group): cuando se desean analizar caracteres en los miembros de un grupo monofilético, se deben buscar los homólogos a estos en su grupo hermano. Si se presentan estos homólogos, resultan ser plesiomórficos para el grupo monofilético en consideración; pero si el homólogo está ausente en el grupo hermano y es único al grupo monofilético bajo estudio, entonces es apomórfico a este. Sin embargo, la regla del grupo externo ha estado bajo una fuerte polémica por lo que debe ser utilizada cuidadosamente (Forey *et al.*, 1992).

El uso de la cladística para inferir relaciones filogenéticas es un procedimiento que implica un cálculo aproximado sobre una historia evolutiva. El objetivo de la inferencia filogenética es construir un árbol evolutivo a partir de la información disponible de los diferentes caracteres que se han estimado en los taxa objeto de estudio. Los caracteres medidos en cada una de las unidades taxonómicas pueden ser tratados de forma individual (tratamiento discreto) como el caso de los métodos de Parsimonia y Máxima Probabilidad, o conjuntamente como el método de distancia (Hillis *et al.*, 1996).

Cabe mencionar que un árbol filogenético es una hipótesis propuesta basándose en un modelo evolutivo particular para explicar las relaciones filogenéticas observadas entre diferentes taxa. Por su parte, un cladograma es un esquema dicotómico que muestra una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas de varios taxa; los cladogramas no reflejan el grado de divergencia. En ellos cada nodo está definido por una o varias sinapomorfias. Finalmente,

los filogramas son iguales a los cladogramas pero indicando el grado de divergencia evolutiva mediante la longitud de las ramas (López-Caballero y Pérez Suárez, 1999).

De manera general, el análisis filogenético se basa en el estudio de determinados caracteres que se suponen importantes en la evolución de los grupos taxonómicos. Dentro de estos caracteres se han empleado los morfológicos, etológicos y recientemente los moleculares.

4.2 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares, considerados como un carácter adicional en los estudios taxonómicos, a diferencia de los caracteres morfológicos, no están influenciados por el ambiente y proporcionan un número ilimitado de caracteres que pueden ser de gran valor en la diferenciación de especies y establecimiento de relaciones filogenéticas (Dodgson *et al.*, 1997).

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariables (Albert *et al.*, 1994; Lewin, 1994).

Los primeros marcadores estudiados a finales de los 70's se basaron en la determinación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero éstos tenían una limitación muy importante: no eran capaces de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies. Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN (Dodgson *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1998).

Un tipo especial de marcadores moleculares puede obtenerse por medio de los análisis de ADN mitocondrial, muy útiles y confiables. En las últimas décadas, los análisis de ADN mitocondrial comenzaron a establecerse como una poderosa herramienta para estudios evolutivos. Estos análisis proveen un método útil en la discriminación de clados íntimamente relacionados, además permiten observar relaciones filogenéticas, biogeográficas y biológicas como en el caso de la hibridación (Moritz *et al.*, 1987; Parker *et al.*, 1998; Snow y Parker, 1998; Ashley, 1999).

4.2.1 ADN Mitocondrial

En mamíferos, el ADN mitocondrial presenta diversas propiedades importantes: una tasa relativamente rápida de sustitución de bases (Martin y Palumbi, 1993); una herencia efectiva haploide y maternal (Birky *et al.*, 1989); es relativamente fácil de aislar y manipular (Moritz, 1994). A su vez, es fácil de caracterizar porque es pequeño ~15-17 kb, circular y notablemente uniforme en el contenido genético. El genoma mitocondrial está compuesto aproximadamente de 37 genes que codifican para 22 ARNst, 2 ARNsr y 13 ARNsm. De esta forma, se encuentra involucrado en las funciones de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa; además está compuesta de una región control, de aproximadamente 1kb, la cual contiene los sitios estructurales para la iniciación de la replicación de ADNmt y la transcripción del ARN (Figura 1) (Wallace, 1986; Moritz *et al.*, 1987; Hillis *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1998).

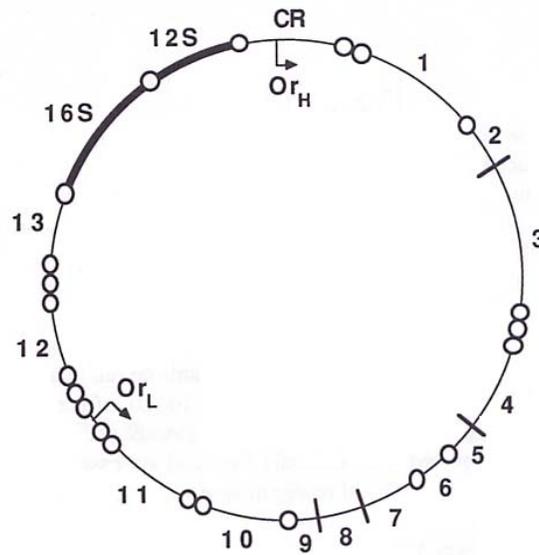


Figura 1. Genoma mitocondrial del ser humano de acuerdo a Avise (1994). Esta compuesto de una región control (CR), 2 genes ARNsr (12S y 16S), 22 ARNst (círculos abiertos) y 13 polipéptidos. También se presentan los sitios (Or_H y Or_L) donde se inicia la replicación.

La evolución del ADN mitocondrial ocurre a través de sustituciones de nucleótidos (nt), de la ganancia o pérdida de nucleótidos, y/o por secuencia y reordenamiento de genes a través del tiempo. El evento de sustitución de nucleótidos ocurre a diferentes tasas en las diferentes regiones del genoma, con la tasa de transiciones (cambios de purina a purina y de pirimidina a pirimidina) excediendo la tasa de tranversiones (cambios de purinas a pirimidinas y viceversa). El evento de ganancia o pérdida de nucleótidos ocurre con menos frecuencia que la sustitución de bases y cuando ocurre generalmente se presenta en regiones no-codificadoras y varía en número (Moritz *et al.*, 1987).

Desde sus inicios, para comparar las secuencias de ADNmt se introdujo el uso de enzimas de restricción (Avise *et al.*, 1979). Éstas rompen en fragmentos específicos las moléculas de ADN; posteriormente los fragmentos son separados por su tamaño mediante electroforesis en gel. Las enzimas reconocen secuencias de nucleótidos particulares, específicas, de pocos nucleótidos de extensión: 4, 5 ó 6 pares de bases de largo, rompiendo los enlaces fosfodiéster dentro de la secuencia. Si los nucleótidos de la secuencia de

reconocimiento no están protegidos por metilación, una enzima de restricción rompe consistentemente esta secuencia. Así, las diferencias en los tamaños de los fragmentos obtenidos digiriendo los ADN homólogos con una enzima dada, reflejan diferencias exactamente en los sitios de reconocimiento en las secuencias (Llorente-Bousquets y Luna, 1994).

Las enzimas de restricción son particularmente valiosas para analizar variabilidad genética intra e inter-específica y las relaciones filogenéticas de especies estrechamente relacionadas. Avise *et al.* (1979) mencionaron algunas características para el análisis de ADNmt usando enzimas de restricción: a) cada fenotipo de restricción complejo es único. Las posibilidades de que un fenotipo idéntico surgiera por convergencia a partir de fenotipos no relacionados son extremadamente remotas; b) los fenotipos se transmiten intactos, inalterados por la recombinación durante la reproducción sexual, de tal manera que cualquier cambio en las secuencias sólo puede surgir por mutación; c) la tasa de aparición de nuevos fenotipos por mutación es significativa pero no incontrolablemente alta; d) los fenotipos son fácil y rápidamente obtenidos.

4.2.1.1 Región Control

En roedores y en general en el grupo de los mamíferos, el genoma mitocondrial es extremadamente compacto, con dos regiones no codificantes que corresponden más o menos al 7% del genoma entero (1000 nucleótidos [nt] aproximadamente). La principal región no codificante del ADNmt, de aproximadamente 1000 nt de longitud, es conocida como región control (D-Loop [displacement loop]), conteniendo una peculiar estructura de triple cadena. Esta estructura es creada por la cadena pesada (H) 7S ADNmt (Larizza *et al.*, 2002).

En mamíferos, la región control está conformada por tres dominios: el dominio ETAS (extended termination-associated sequence) (abarca del ARNt_{pro} al dominio central), el

dominio central (CD, domain central), y el dominio CSB (conserved sequence block) (abarca del CD al ARN^t_{fen}), (Fig. 2).

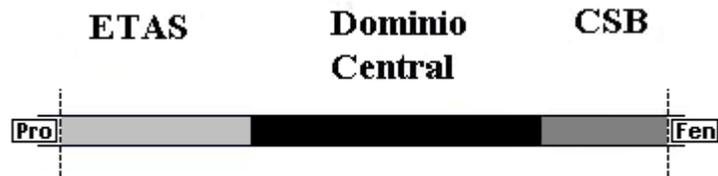


Figura 2. Esquema general de la región control del ADN mitocondrial de mamíferos de acuerdo a Larizza *et al.* (2002). La región control es limitada por los genes ARN^t_{Pro} y ARN^t_{Fen}

El dominio ETAS puede contener dos bloques conservados, llamados ETAS1 y ETAS2. También el dominio CSB puede presentar cortos bloques de secuencias conservadas, nombradas CSB1, CSB2 y CSB3 por Walberg y Clayton (1981).

Los dominios ETAS y CSB (región de alta importancia por contener el origen de la replicación) presentan alta variación genética intra-específica para análisis genéticos poblacionales; por su parte el dominio central es altamente conservado en todas las especies, aunque su función es desconocida (Sbisà *et al.*, 1997).

La evolución de la región control del ADNmt de mamíferos muestra varias características peculiares, como son la presencia de elementos repetidos y una fuerte inserción/delección de caracteres en algunos dominios (Saccone *et al.* 1991; Sbisà *et al.* 1997, Pesole *et al.*, 1999).

4.2.1.2 Citocromo b

De los genes mitocondriales codificadores de proteínas, el citocromo b ha sido el más extensamente estudiado debido en gran medida al trabajo pionero de Wilson y sus colegas (Kocher *et al.*, 1989; Irwin *et al.*, 1991), quienes identificaron una secuencia única de

“cebadores universales” que pueden ser usados para amplificar porciones de este gen en diferentes especies de animales, como son reptiles, mamíferos, entre otros. En roedores, la longitud de este gen es de aproximadamente 1140 nt (Spradling *et al.*, 2001). El citocromo b funciona como una subunidad del complejo III (citocromo bc1), el cual es un componente obligatorio de la cadena respiratoria (Mitchell, 1976). El citocromo b ha sido considerado uno de los genes más útiles para los trabajos filogenéticos, y probablemente es el gen mitocondrial mejor conocido con respecto a la estructura y función de sus productos proteínicos (Esposti *et al.*, 1993). Sin embargo, algunos problemas han sido encontrados cuando se usa el citocromo b, como son la tasa de variación entre linajes, la saturación en la tercera posición de los codones y la variación limitada en la primera y segunda posición de los mismos, resultando en ocasiones, en poca información filogenética para resolver relaciones evolutivas intra-específicas (Meyer, 1994).

4.2.1.3 ARNr 16S

Las secuencias de ARN son ampliamente usadas para análisis filogenéticos e identificación de especies. Para la filogenia, las secuencias de ARNr son utilizadas constantemente debido a que tienen una función conservada, son fáciles de secuenciar y están constituidas de una intersección de dominios altamente conservados y muy variables (Cilia *et al.*, 1996). La subunidad del ADN ribosomal grande (el ARNr de LSU) tiene una información más amplia que la subunidad pequeña del ADN ribosomal (el RNAr de SSU), no sólo debido a su mayor tamaño sino también porque contiene dominios de rápida expansión y una tasa de mutación más alta (Hassouna *et al.*, 1984), lo cual podría ser más adecuado para una evaluación de especies estrechamente relacionadas. En roedores, la longitud de gen 16Sr es de aproximadamente 1500 nt (Bayona-Bafaluy *et al.*, 2003).

5. ANTECEDENTES

5.1 Familia Sciuridae

La familia de las ardillas, Sciuridae, es una de las familias más diversas y ampliamente distribuidas de mamíferos. Con más de 270 especies que pertenecen a 50 géneros, los miembros de esta familia se distribuyen en todos los continentes con excepción de la Antártica y Australia. (Hoffmann *et al.*, 1993).

La clasificación taxonómica de la familia Sciuridae se presenta en la Tabla 1 donde observamos que presenta dos subfamilias, Petauristinae y Sciurinae, en las cuales se encuentran incluidas todas las especies que constituyen la familia.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Sciuridae de acuerdo a Maddison *et al.* (2001). Entre paréntesis se presentan algunos nombres comunes y el número de géneros que componen cada tribu.

Orden Rodentia

Suborden Sciurognathi

Familia Sciuridae

Subfamilia Petauristinae (ardillas voladoras) (14)

Glaucomys, Petaurista

Subfamilia Sciurinae

Tribu Callosciurinae (ardillas arborícolas de Asia) (12)

Callosciurus, Tamiops

Tribu Funambulini (ardillas africanas) (4)

Funisciurus

Tribu Marmotini (5)

Subtribu Marmotina (marmotas)

Marmota

Subtribu Spermophilina (ardillas de tierra y perritos de las praderas)

Spermophilus, Ammospermophilus, Cynomys

Tribu Tamiini (ardillas listadas) (2)

Tamias, Eutamias

Tribu Sciurini (ardillas arborícolas) (3)

Sciurus, Sciurillus

Tribu Ratufini (ardillas gigantes) (1)

Tribu Microsciurini (ardillas pequeñas neotropicales) (2)

Microsciurus

Tribu Protoxerini (ardillas de palma) (3)

Epixerus, Protoxerus

Tribu Tamasciurini (1)

Tamasciurus

Tribu Xerini (ardillas terrestres africanas) (3)

Xerus

5.2 Descripción de las especies de estudio

5.2.1 *Cynomys mexicanus* Merriam, 1892

5.2.1.1 Taxonomía

El perrito mexicano de las praderas (*Cynomys mexicanus*) es un mamífero perteneciente al orden Rodentia, al suborden Sciurognathi y es una de las 5 especies que componen a la familia de las ardillas (Sciuridae) (Tabla 2). Es una especie monotípica que fue capturada por primera vez en 1880 por el Dr. Edward Palmer, quien encontró una colonia en un valle rodeado de montañas al este de Saltillo, Coahuila (Pizzimenti, 1975).

Tabla 2. Ubicación taxonómica de *Cynomys mexicanus* de acuerdo a Hall (1981).

Clase: Mammalia
Orden: Rodentia
Suborden: Sciuromorpha
Familia: Sciuridae
Subfamilia: Sciurinae
Subgénero: <i>Cynomys</i>
Especies: <i>Cynomys mexicanus</i> , <i>C. ludovicianus</i>
Subgénero: <i>Leucocrossuromys</i>
Especies: <i>C. gunnisoni</i> , <i>C. leucurus</i> y <i>C. parvidens</i>

5.2.1.2 Diagnosis

Merriam (1892) fue el primero en describirla, basándose en ejemplares recolectados por Clark P. Streater en La Ventura, Coahuila. También conocidos como chulos de llano, perrito llanero o perrito mexicano de las praderas, es una de las especies más grandes de *Cynomys*. La longitud total de los adultos se encuentra entre 385 y 440 mm; existe dimorfismo sexual ya que las hembras son aproximadamente el 15% más pequeñas que los machos. Son roedores de cuerpo robusto con un peso promedio de 1 Kg. La coloración de los perros

llaneros varía entre pardo amarillento y pardo rojizo, y se encuentra salpicada con algunos pelos negros; el vientre es más claro y la parte terminal de la cola es negra (Fig. 3). Poseen 8 mamas: cuatro en posición pectoral y cuatro inguinales (Ceballos y Wilson, 1985; Ceballos y Mellink, 1990; Hoogland, 1995). Pizzimenti (1975) registró las siguientes medidas (media con desviación estándar en paréntesis): longitud total, 389.5 (24.5); longitud de la cola, 88.7 (10.6); longitud de la pata trasera, 60.4 (2.9) y longitud condilobasal, 58.7 (2.0).



Figura 3. Imagen de *C. mexicanus*. Foto tomada por Alejandro Soto C. durante el trabajo de campo en San Luis Potosí, 2003.

5.2.1.3 Origen

No se tienen registros fósiles de *Cynomys mexicanus*, y en general, el género *Cynomys* es desconocido antes del Pleistoceno. Sin embargo, varias especies cercanas al género, de esta época, han sido descritas, aunque ninguna proporciona un enlace directo con *C. mexicanus*. El perrito mexicano de las praderas probablemente se originó como una población relicto de *C. ludovicianus*, que quedó aislada durante las glaciaciones del Pleistoceno, debido a la expansión y contracción de los intervalos geográficos de esta especie. A pesar de ello, *C. mexicanus* y *C. ludovicianus* siguen siendo especies estrechamente relacionadas; las diferencias genéticas entre ellas se encuentran a nivel de los cromosomas y proteínas

(Pizzimenti, 1975), no obstante la pequeña magnitud de estas diferencias indica que ambos taxa fueron parte de una misma unidad reproductiva en el pasado reciente. En la actualidad, las poblaciones de *C. ludovicianus* más cercanas de *C. mexicanus* se encuentran separadas por el desierto de Sonora y Chihuahua (530 km) (Treviño-Villarreal y Grant, 1998).

5.2.1.4 Distribución

El perrito mexicano de las praderas es una especie endémica de México cuya distribución actual abarca los estados de Coahuila, Nuevo León y San Luis Potosí (Fig. 4); está limitada al norte y al este por la Sierra Madre Oriental, y al sur y oeste por lomeríos y planicies con vegetación más árida. Esta distribución es muy semejante a la histórica, a pesar de que algunos grupos han sido exterminados y la mayoría se han reducido en tamaño y densidad (Ceballos y Mellink, 1990). Su distribución abarcaba zonas semi-desérticas del estado de Zacatecas y, dentro de esta entidad, la colonia de Ciénega de Rocamontes fue reportada como activa (perritos de las praderas presentes) hasta 1970 y 1975, sin embargo actualmente aparece como inactiva (solo viejos montículos y madrigueras cerradas), (Ceballos y Mellink, 1990; Treviño-Villarreal y Grant, 1998).

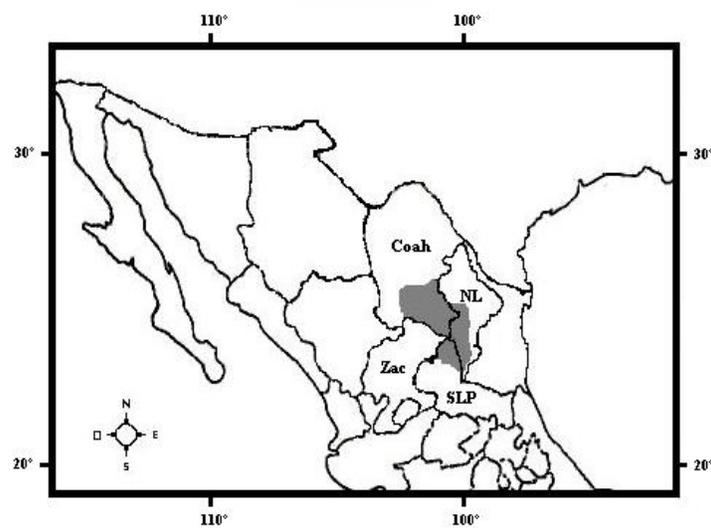


Figura 4. Distribución geográfica actual de *Cynomys mexicanus* de acuerdo a Treviño-Villarreal y Grant (1998).

5.2.1.5 Hábitat

Las colonias de estos roedores están confinadas a una vegetación semiárida (obs. pers.) y, de acuerdo a Rzedowski (1990), el tipo de vegetación predominante en la zona es matorral xerófilo (Fig. 5), caracterizada por pastos y plantas rasantes entre 1600 y 2000 msnm. Habitan valles con escasa o nula pendiente y suelos bien drenados dentro de su territorio. Es común que sus colonias se encuentren rodeadas de una vegetación más árida, la cual forma una barrera impenetrable para su dispersión (Ceballos y Mellink, 1990).



Figura 5. Localidad “El manantial” (SLP) donde se aprecia el tipo de vegetación semiárida predominante. M= montículos, P= perrito de la pradera.

5.2.1.6 Ecología

Son considerados como una especie clave ecológicamente hablando, ya que al establecerse en colonias causan impactos profundos que modifican el paisaje, incrementan la heterogeneidad ambiental e inciden en la diversidad biológica. Sus actividades, especialmente cavar madrigueras y destruir la vegetación erguida, influyen directamente en las características fisiológicas del paisaje, en las propiedades físicas y químicas del suelo, en el ciclo hidrológico,

en la estructura de la vegetación, en la descomposición de materia vegetal y en las relaciones inter-específicas de vertebrados e invertebrados.

La heterogeneidad ambiental causada por las actividades de forrajeo y construcción de madrigueras de los perros llaneros propicia la colonización y permanencia de un gran número de especies de vertebrados, y son la base para el mantenimiento de la diversidad biológica regional. Entre las especies que dependen estrechamente de las colonias de perros llaneros se encuentran, el tlacoyote (*Taxidea taxus*), la zorra norteña (*Vulpes velox*), el águila real (*Aquila chrysaetos*), el águila de cabeza blanca (*Haliaeetus leucocephalus*), el aguililla real (*Buteo regalis*), el tecolote llanero (*Athene cunicularia*) y el chorlito llanero (*Charadrius montanus*), (Campbell y Clark, 1981; Whicker y Detling, 1988; Ceballos y Pacheco, 2000).

En contraste con otras especies de *Cynomys* que viven en latitudes altas, ésta especie no tiene un periodo de inactividad o hibernación en el invierno. Por su parte, la depredación en la especie no ha sido registrada y se piensa que sus depredadores son tejones (*Taxidea taxus*), coyotes (*Canis latrans*), comadreja (*Mustela frenata*), águilas doradas (*Aquila chrysaetos*), halcones de cola roja (*Buteo jamaicensis*) y serpientes de cascabel (*Crotalus* sp.) (Ceballos y Wilson, 1985; Hoogland, 1995).

5.2.1.7 Etología

Son roedores herbívoros y de hábitos semiescavadores. Son animales terrestres de actividad exclusivamente diurna, que habitan zonas semiáridas. Sus madrigueras son complicadas galerías subterráneas, de túneles de hasta 34 m de largo y 5 m de profundidad, con un número variable de cámaras que usan con diferentes propósitos. La tierra que sacan de los túneles la acumulan a la entrada de las madrigueras, formando montículos cónicos, lo que le da al paisaje de sus colonias un aspecto muy peculiar. Los montículos tienen varias funciones, ya que sirven como un puesto de observación para advertir la presencia de depredadores, y son una barrera para evitar la entrada ya sea de granizo o lluvia. Viven en colonias, divididas en pabellones, y tienen una organización social compleja.

Han desarrollado un alto grado de organización social, siendo ese comportamiento uno de los factores más importantes de su adaptación y supervivencia. Las unidades sociales funcionales se denominan *camarillas* o *pueblos*, que por lo general constan de un macho adulto dominante, de una a cuatro hembras adultas y un grupo de crías de menos de dos años. Estos grupos familiares despliegan una conducta territorial muy agresiva hacia otros grupos.

Otra consecuencia de la vida gregaria de los perros llaneros es la forma de comunicación por medio de diferentes vocalizaciones o “llamados”, que les permite mantenerse en contacto con el resto de la colonia, así como prevenir los ataques de sus depredadores. El sonido es similar a un ladrido, característica de la que deriva su nombre común (Vaughan, 1988; Ceballos y Pacheco, 2000).

5.2.1.8 Aspectos Genéticos

Cynomys mexicanus tiene un número diploide de 50 cromosomas, con 12 pares de autosomas metacéntricos, 11 pares de submetacéntricos y 1 par de acrocéntricos. El cromosoma X es grande y submetacéntrico, y el Y es pequeño y acrocéntrico. Es una especie polimórfica para los alelos transferina2 (Tf2) y transferina3 (Tf3) y la carencia de la transferina1 (Tf1); Tf2 es el alelo más común de la especie (Ceballos y Wilson, 1985).

5.2.1.9 Reproducción

La reproducción es anual. El periodo de crianza de *C. mexicanus* parece ser extremadamente largo, ocurriendo desde finales del invierno hasta el verano. En individuos en cautiverio se ha observado que los machos contienen espermatozoides maduros en enero, febrero y julio. La longitud del periodo de gestación es desconocida, sin embargo, este puede ser de aproximadamente 1 mes como ocurre en otras especies del género *Cynomys*. Las crías recién nacidas son ciegas y con poco pelo. El pelo comienza a desarrollarse después de las dos

semanas. La pigmentación comienza a desarrollarse después de los doce días. Entre la 4a. y 5a. semana las crías comienzan a abrir los ojos (Ceballos y Wilson, 1985).

5.2.1.10 Estatus y conservación

El perro llanero mexicano es una especie que actualmente está clasificada en peligro de extinción (Arita y Ceballos, 1997; Treviño-Villarreal y Grant, 1998). La disminución de sus poblaciones se debe a varios factores: a la cacería por parte de los lugareños para fines de alimentación, a la destrucción de su hábitat debido a la introducción del ganado (en su mayoría caprino), a las sequías prolongadas que afectan la disponibilidad de alimento, a la presencia de un buen número de depredadores naturales (coyotes, zorras, aves rapaces, serpientes) que están limitando el crecimiento de sus poblaciones silvestres. Otro factor que comienza a afectar el desarrollo y crecimiento natural de las poblaciones y que en un futuro próximo podría ser devastador, es la presencia de ranchos y pueblos cada vez más cercanos a las áreas donde se encuentran estos organismos (obs. pers.).

Su futuro es incierto, ya que existen presiones humanas intensas en toda su área de distribución actual además de que las zonas más adecuadas para su proliferación han sido fragmentadas por carreteras y caminos de terracería, que han permitido el acceso a su hábitat, incrementando las presiones sobre esta especie (Whicker y Detling, 1988; Ceballos y Mellink, 1990).

5.2.2 *Spermophilus spilosoma* Bennett, 1833

5.2.2.1 Taxonomía

La ardilla de tierra manchada (*Spermophilus spilosoma*) es un mamífero que fue descrito en 1833 por E. T. Bennett en Durango. Pertenece al orden Rodentia, familia Sciuridae. (Streubel y Fitzgerald, 1978). La especie se encuentra incluida dentro del subgénero *Ictidomys* (Tabla 3) y consta de 10 subespecies (Alarcón, 2003).

Tabla 3. Posición taxonómica de las especies del género *Spermophilus* de acuerdo a Hall (1981) y Nadler *et al.* (1982).

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia

Suborden: Sciuromorpha

Familia: Sciuridae

Subfamilia: Sciurinae

Subgénero: *Otospermophilus*

Especies: *Spermophilus adocetus*, *S. annulatus*, *S. atricapillus*, *S. beecheyi*, *S. variegatus*

Subgénero: *Spermophilus*

Especies: *S. alashanicus*, *S. armatus*, ***S. beldingi****, ***S. brunneus****, *S. citellus*, *S. dauricus*, *S. elegans*, *S. xantoprymnus*, *S. musicus*, *S. pygmaeus*, *S. relictus*, *S. richardsonii*, *S. suslicus*, ***S. townsendii****, ***S. washingtoni****, *S. vigilis*, ***S. columbianus****, *S. parryi*, *S. undulatus*.

Subgénero: *Colobotis*

Especies: *S. erythrogegensys*, *S. fulvus*, *S. major*

Subgénero: *Potiocitellus*

Especies: *S. franklini*

Subgénero: *Callospermophilus*

Especies: ***S. lateralis****, ***S. madrensis****, *S. saturatus*

Subgénero: *Ictidomys*

Especies: ***S. mexicanus****, *S. perotensis*, ***S. spilosoma*****, *S. tridecemlineatus*

Subgénero: *Xerospermophilus*

Especies: *S. mohavensis*, ***S. tereticaudus****

**Especie de estudio; *especies adicionales incluidas en el trabajo.

5.2.2.2 Diagnosis

Spermophilus spilosoma es una pequeña ardilla de 200 gramos de peso, de cuerpo alargado, en promedio de 20 cm de longitud, su cola es delgada y mide un tercio de la longitud total; su pelaje es de color marrón claro y presenta manchas blancas no lineales en la parte dorsal de su cuerpo, característica de la que deriva parte de su nombre común. El intervalo de sus medidas (en mm) son las siguientes: longitud total, de 185 a 253; cola de 55 a 92; pata trasera de 28 a 30; las longitudes registradas del cráneo están entre 34.1 a 42.7 (Hall, 1981) (Fig. 6).



Figura 6. Imagen de *Spermophilus spilosoma*. Foto tomada por Robert R. Parmenter en 1998.

5.2.2.3 Origen

Sólo se tienen informes de Harris y Findley (1964), quienes reportaron que fósiles de *S. spilosoma* se encontraron junto con fósiles de *Cynomys gunnisoni* en Nuevo México; y Dalquest (1967) quien descubrió 18 dentaduras parciales y completas, aisladas de *S. spilosoma* del Pleistoceno, en Texas.

5.2.2.4 Distribución

El intervalo de distribución de esta especie va desde el centro-sur del sur de Dakota, a través de las colinas de Nebraska, y dentro del sureste de Wyoming; también se presentan en el este de Colorado, noroeste de Oklahoma, oeste de Kansas, oeste de Texas, parte de Nuevo México, sureste de Utah y este de Arizona, norte a centro de México (Streubel y Fitzgerald, 1978) (Fig. 7).

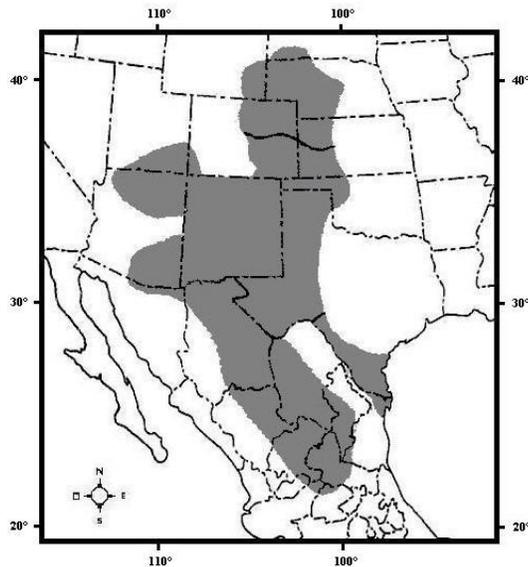


Figura 7. Distribución geográfica actual de *Spermophilus spilosoma* de acuerdo a Hall (1981).

5.2.2.5 Ecología

La ardilla de tierra es generalmente encontrada en áreas de suelos arenosos profundos y vegetación escasa. McCampbell (1926) capturó dos *S. spilosoma* en montículos abandonados de perritos de las praderas, en Colorado. En la misma región, Streubel (1975) estudió a *S. spilosoma* en simpatria con *S. tridecemlineatus* en áreas donde predominan pastos como *Distichlis stricta*, *Festuca octoflora* y *Bouteloua gracilis*.

5.2.2.6 Etología

Sumrell (1949) reportó que el forrajeo y alimentación comprenden aproximadamente el 66% de toda la actividad sobre la tierra, el comportamiento de alerta el 15%, otros tipos de comportamientos de mantenimiento (que incluyen aseo, descanso en la sombra, defecación, entre otros) el 8%, comportamiento de investigación (no-forrajeo) 6%, y comportamiento sexual y agonístico menos del 2% para machos y menos del 0.5% para hembras.

Generalmente están inactivos cuando hay vientos fuertes o lluvia. En Colorado, los machos emergen de la hibernación del 1 al 15 de Abril y las hembras del 20 de Abril al 15 de Mayo. En este mismo lugar, los machos comienzan la hibernación a finales de Julio. El ciclo de la actividad fue estimado de 115 a 135 días para machos y de 95 a 125 días en hembras (Streubel y Fitzgerald, 1978). Estos organismos no forman colonias (obs. pers.).

5.2.2.7 Aspectos Genéticos

Nadler y Hughes (1966) examinaron los cariotipos de *S. pilosoma* y encontraron que tienen 32 cromosomas, con la peculiar característica de que carecen de un par de metacéntricos con respecto a *S. tridecemlineatus* y *S. mexicanus*.

5.2.2.8 Reproducción

Estos organismos son polígamos, en donde los machos tienen acceso a varias hembras quienes son el sexo limitante y el cuidado parental es exclusivo de las hembras (Aragón y Baudoin, 1989). El periodo de gestación de *S. pilosoma* no ha sido documentado, pero podría ser parecido a *S. tridecemlineatus* cuya gestación es reportada de 27 a 28 días (Bridgewater, 1966). Streubel (1975), analizó el periodo de crianza de *S. pilosoma obsoletus* en Colorado basadas en observaciones de comportamiento y en la presencia de espermados maduros en los testículos y epidídimos de machos. El comienzo de la crianza se da a mediados de Abril, dos a tres semanas después de la emergencia de la hibernación y a mediados de Julio la crianza

finaliza. Sumrell (1949) observó que en los machos de *S. pilosoma marginatus*, en Nuevo México, descienden los testículos a mediados de Abril y que son abdominales a principios de Agosto. En Colorado, Streubel (1975) recolectó hembras preñadas en Mayo y Julio; los pesos del tracto reproductivo de las hembras y las observaciones del comportamiento indicaron que la crianza ocurre en Mayo y Junio pero algunas ocurren a principios de Julio.

5.2.2.9 Estatus y conservación

La ardilla de tierra manchada es una especie que actualmente no se encuentra clasificada en ninguna de las categorías de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES, 2001).

5.3 Estudios a nivel Molecular

Los estudios sobre ADN mitocondrial han sido recientes, en 1966 se aisló y caracterizó el primer ADN mitocondrial de vertebrados; desde entonces, en numerosos laboratorios se han venido estudiando intensamente los ADN mitocondriales de muchos organismos (Grivell, 1983). En los últimos años se han elaborado diversos estudios a nivel del ADN mitocondrial para especies pertenecientes a la familia de los taxa de estudio (Sciuridae).

5.3.1 Región control

Se han elaborado estudios basados en secuencias de la región control del ADN mitocondrial, como son los trabajos de Oshida *et al.* (2001) quienes investigaron la diversidad genética en 17 localidades de la ardilla gigante voladora japonesa, *Petaurista leucogenys*, en Honshu, Shikoku y en las islas de Kyushu de Japón; las relaciones filogenéticas reconstruidas, usando métodos de máxima parsimonia, indicaron que esta especie está separada en tres linajes principales, el grupo A que consiste de un simple haplotipo de Kyushu, el grupo B que consta de algunos haplotipos de Kyushu y un haplotipo de Honshu, y el grupo C que presenta haplotipos tanto de Kyushu como de Honshu. Barratt *et al.* (1999), por su parte, examinaron las relaciones de 207 individuos de la ardilla roja, *Sciurus vulgaris*, en 15 localidades de Gran Bretaña y del Continente Europeo, detectando alta variación genética entre algunas de éstas poblaciones, sin embargo los análisis filogenéticos no revelaron una divergencia evolutiva entre los haplotipos de Gran Bretaña y el Continente Europeo.

5.3.2 Citocromo b

Otros trabajos se han basado en secuencias nucleotídicas del gen citocromo b para cumplir sus objetivos de estudio. En este contexto tenemos a Wettstein *et al.* (1994), quienes examinaron las relaciones evolutivas entre subespecies de *Sciurus aberti*, pertenecientes a diversas poblaciones del suroeste de Estados Unidos y México, por medio de polimorfismo en

sitios de restricción, lo cual reveló la presencia de dos grupos: el grupo Albert/Kaibab y el grupo Ferreus/Chuska; entre ellos se presentó una gran divergencia nucleotídica, con una separación de linajes estimada en aproximadamente 572,000 años, asumiendo una tasa de sustitución de nucleótidos de 7.15×10^{-9} /año/sitio.

Demboski *et al.* (1998) estudiaron a 56 ardillas voladoras (*Glaucomys sabrinus*) de Alaska, Washington y del territorio Yukon; las ardillas de Washington fueron altamente divergentes (7.3%) con respecto a las dos localidades restantes, sin embargo la variación entre Alaska y el territorio Yukon fue mínima (<0.3%); la variación mitocondrial es consistente para el reconocimiento de *G. sabrinus griseifrons*.

Arbogast (1999) llevó a cabo inferencias de las historias evolutivas y biogeográficas de las ardillas voladoras, por un lado, *Glaucomys sabrinus*, con dos linajes reconocidos, el linaje oeste y el linaje este (uno con poblaciones del oeste de California, Oregon y Washington, y el otro, mucho más grande con poblaciones de Carolina del Norte, Oeste de Virginia, Michigan, Utah, Alaska, Washington y Alberta, respectivamente) y por otro lado, *G. volans*, donde solamente un gran linaje fue reconocido; se observó poca variación en las secuencias entre poblaciones de *G. volans* ($\leq 0.6\%$), pero la variación de las secuencias dentro de *G. sabrinus* fue mucho más alta (2.3% y 2.6% entre los clados del oeste y este, respectivamente, y 4.3-7.2% entre los dos clados); los niveles mínimos de divergencia de secuencias entre los tres clados fueron cercanamente iguales (aproximadamente 4% en todas las comparaciones).

Por su parte, Oshida *et al.* (2000) investigaron las relaciones filogenéticas entre seis géneros de ardillas voladoras (*Belomys*, *Hylopetes*, *Petaurista*, *Petinomys*, *Pteromys*, de Asia, y *Glaucomys* de Norte América), a partir de secuencias nucleotídicas parciales del gen citocromo b; se encontró una relación cercana entre *Hylopetes* y *Petinomys*, mientras que *Petaurista* estuvo cercanamente relacionado a *Pteromys*; mientras tanto, *Glaucomys* estuvo más estrechamente relacionado al conglomerado consistente de *Hylopetes* y *Petinomys*.

Oshida y Masuda (2000) investigaron las relaciones filogenéticas y la historia biogeográfica de *Sciurus* del Nuevo Mundo y *Sciurus* del Viejo Mundo, a partir de las secuencias nucleotídicas parciales del gen citocromo b de seis especies diferentes de *Sciurus* (*S. aberti*, *S. carolinensis*, *S. lis*, *S. níger*, *S. stramineus* y *S. vulgaris*); las distancias genéticas entre las especies de *Sciurus* del Nuevo Mundo fueron remarcadamente más grandes que entre dos especies del mismo género del Viejo Mundo.

Por último, mencionaremos a Kruckenhauser *et al.* (1999) quienes establecieron la filogenia de 11 especies del género *Marmota*; en los cladogramas deducidos a partir de las secuencias nucleotídicas del gen citocromo b, se obtuvieron dos distintos conglomerados: uno consistente de especies de Norte América, y el otro, contuvo especies de Eurasia junto con la especie *Mamota monax* de Norte América; la posición de *M. monax* como un miembro del clado de Eurasia concuerda con la evolución del número de cromosomas.

5.3.3 ARNr 16S

Referente a estudios con el gen 16S existen pocas investigaciones al respecto. Mercer y Roth (2003) analizaron las secuencias de ADN para géneros modernos de ardillas actualmente reconocidas, así como ardillas arborícolas del Norte, Centro y Sudamérica, y basados en tres genes, entre ellos el gen 12S y el gen 16S; a partir de análisis filogenéticos y de reloj molecular, los autores infirieron que la llegada y diversificación de ardillas al continente Africano, a través del estrecho de Bering y del Istmo de Panamá, coincide en tiempo y localización de múltiples eventos paleontológicos y de la teoría de tectónica de placas que han sido documentados.

5.3.4 Especies objeto de este estudio

Hasta el momento son pocos los estudios elaborados sobre aspectos moleculares y/o filogenéticos de *Cynomys mexicanus*. Tenemos los trabajos de McCullough y Chesser (1987), quienes reportan datos sobre la variabilidad genética dentro y entre tres poblaciones de *C.*

mexicanus en Nuevo León y Coahuila, basados en la variación electroforética de 45 loci (izoenzimas); las distancias genéticas entre las poblaciones fueron bajas (distancia de Rogers, 0.033 a 0.045), y la media F_{ST} de todos los loci variables fue de 0.07 (no significativo), lo que indicó una baja heterogeneidad entre las poblaciones muestreadas. Y por otro lado, el trabajo de Pizzimenti (1975) quien analiza la variación genética (cariotipos y proteínas [transferinas]) morfológica (medidas craneales y externas) y geográfica (análisis univariado, análisis de discriminantes y análisis de componentes principales) de todas las especies de *Cynomys*, observando los patrones resultantes en función de variables climáticas, fisiográficas y de distribución.

Por su parte, Herron *et al.* (en prensa) analizaron secuencias nucleotídicas del gen citocromo b de 114 especies de la familia Sciuridae, incluyendo *C. mexicanus* y *S. spilosoma*, para inferir relaciones filogenéticas basados en métodos bayesianos y de máxima parsimonia. Sus resultados indicaron conflictos entre las relaciones filogenéticas y la taxonomía actual, a todos los niveles del grupo. Para la familia Sciuridae no se encontró una división filogenética en dos subfamilias (Petauristinae y Sciurinae). A nivel de tribu, la ardilla pigmeo neotropical, *Sciurillus*, no se ubicó estrechamente relacionada con otras especies de la tribu Sciurini. A nivel de género, *Sciurus* resultó parafilético con respecto a ardillas pequeñas (*Microsciurus*), y las ardillas terrestres holárticas (*Spermophilus*) resultaron parafiléticas con respecto a ardillas antílope (*Ammospermophilus*), perritos de las praderas (*Cynomys*) y marmotas (*Marmota*). Finalmente, varias especies de ardillas listadas (*Tamias*, *Eutamias*) y de ardillas de tierra holárticas no aparecen como grupos monofiléticos lo que indica la necesidad de una revisión taxonómica alfa.

6. JUSTIFICACIÓN

Cynomys mexicanus es una especie que se distribuye en algunas zonas dentro de los estados de Coahuila, Nuevo León y San Luis Potosí, aislada geográficamente del resto de las especies del género *Cynomys*. Al interior de algunas localidades donde habita *C. mexicanus* se encuentra a *Spermophilus spilosoma* coexistiendo. Dado el hecho de compartir las mismas localidades, la dificultad que presentan ambas especies para colonizar nuevas localidades y por la forma tan peculiar de vida, ya explicada con anterioridad, se podría pensar que las dos especies están experimentando un proceso de evolución similar, no obstante, hasta el momento poco es lo que se conoce sobre las relaciones filogenéticas de ellas. Por ello en este estudio se analizan, a nivel del gen citocromo b, el gen 16S y la región control, las relaciones filogenéticas, por un lado, entre *C. mexicanus* y *S. spilosoma* y por otro, de éstas especies con respecto a otras de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus*. Cabe mencionar que, para mamíferos, el gen citocromo b y el gen 16S son regiones del ADNmt altamente conservadas, y la región control se caracteriza por ser una región muy variable, a nivel intra-específico. Finalmente, este estudio tiene gran importancia por presentar, por primera vez, datos sobre la caracterización del gen citocromo b y la región control, así como de enzimas de restricción para ambas especies en las localidades de estudio.

7. HIPÓTESIS

Si la región control es una región no codificante (menos conservada) y el citocromo b es un gen codificador de proteínas (más conservado), entonces el empleo de éstas dos regiones del ADNmt proporcionará información significativa para el elucidar diferencias a nivel intra-específico e inter-genérico en *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus pilosoma*, asimismo permitirán inferir las relaciones filogenéticas entre éstas especies y otras de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus*, lo cual proporcionará un primer paso para el entendimiento de la filogenia de ambas especies.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

- Analizar la región control, el gen citocromo b y el gen ARNr 16S, del genoma mitocondrial (ADNmt), en *C. mexicanus* y *S. spilosoma*, para identificar su aporte informativo en inferencias filogenéticas y determinación de la variabilidad genética.

8.2 Objetivos particulares

- Secuenciar y caracterizar la región control y el gen citocromo b de *C. mexicanus* y *S. spilosoma*.
- Inferir relaciones filogenéticas inter-genéricas y/o intra-específicas, con la región control y el gen citocromo b.
- Analizar la diversidad genética (haplotipos) generados por restricción enzimática de los fragmentos amplificados por PCR, con la región control, el gen citocromo b y el gen 16Sr, con las especies de estudio.

9. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en los estados de San Luis Potosí y Coahuila, México. En dichos estados, los perritos mexicanos de las praderas y las ardillas de tierra manchada ocupan suelos yesíferos bastante pobres para la producción agropecuaria, ocupando áreas que se caracterizan por herbáceas y algunos pastos de escasa altura (5 cm). Su fisonomía es la de una pradera con escasa vegetación. Algunas especies de plantas herbáceas típicas del hábitat de *C. mexicanus* son la leandrilla (*Aristida sp.*), el gamón (*Asphodellus fistulosus*), el daisillo (*Cassia bahuinoides*), la gaura (*Gaura coccinea*), la árnica (*Haplopappus spinulosus*), la maca (*Lepidium montanum*), el salado (*Muhlenbergia repens*), además de *Erioneuron pulchellum*, *Flaveria anomala*, *Dyssodia sp.* y *Denothera rosea* (Ceballos y Mellink, 1990).

De acuerdo al tamaño y ubicación de colonias activas de *Cynomys mexicanus*, registradas por Treviño-Villarreal y Grant (1998), se seleccionaron diversas localidades de esta especie en los estados de San Luis Potosí y Coahuila. Las localidades y/o colonias estudiadas se muestran en la Tabla 4 y Fig. 8.

Tabla 4. Localidades del estado de San Luis Potosí y Coahuila donde se llevó a cabo la recolecta de organismos para el presente estudio.

Localidades	Colonia y Estado	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	Especie(s) capturada(s)
Localidad I	El Manantial, SLP.	24°07'30''	100°55'30''	1,705	<i>C. mexicanus</i>
Localidad II	El Gallo, SLP.	24°12'00''	100°54'06''	1,700	<i>S. spilosoma</i>
Localidad III	San Juan del Retiro, Coahuila	24°51'13''	101°05'00''	1,750	<i>C. mexicanus</i> , <i>S. spilosoma</i>

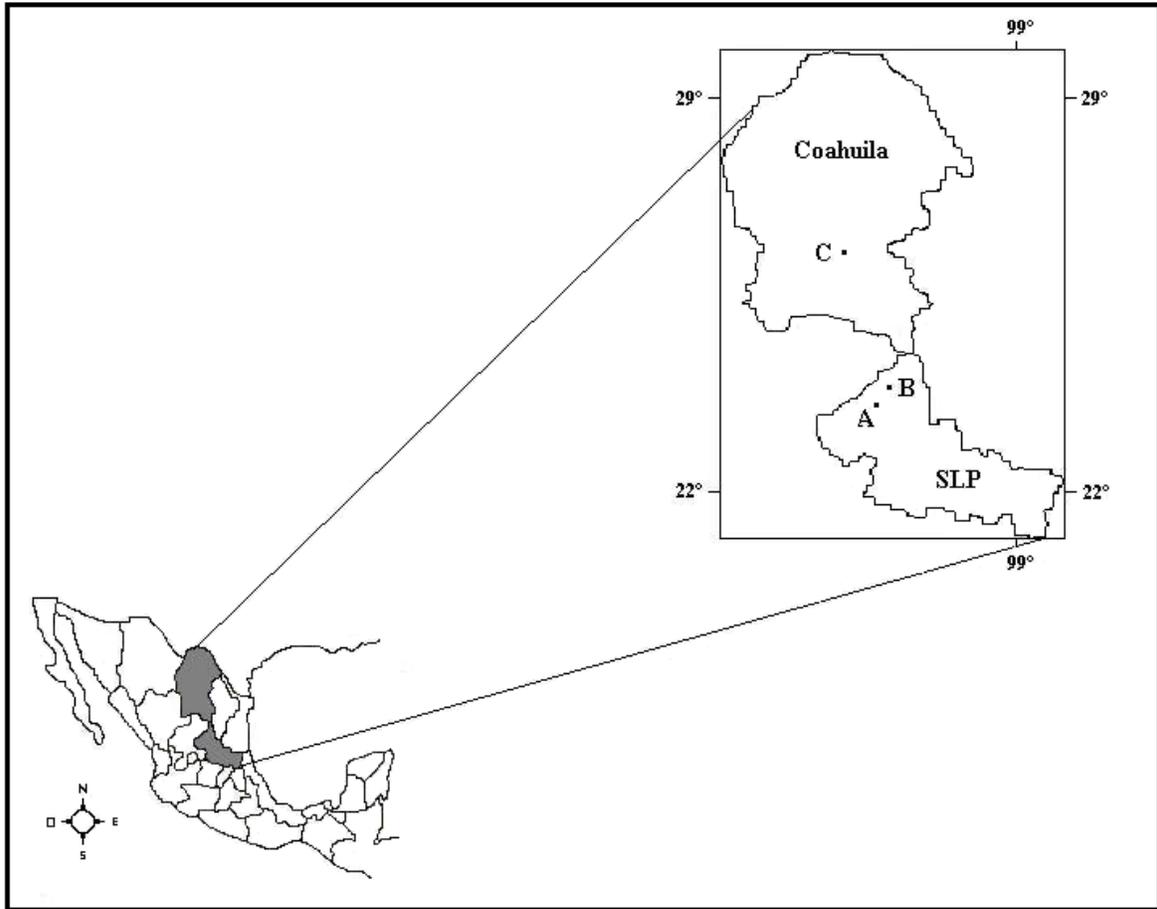


Figura 8. Localización geográfica de los sitios de recolecta. Localidad A, El Manantial, S.L.P. Localidad B, El Gallo, S.L.P. Localidad C, San Juan del Retiro, Coahuila.

10. MATERIAL Y MÉTODO

10.1 Trabajo de campo

10.1.1 Recolecta de organismos

Se recolectó un individuo de *C. mexicanus* y *S. spilosoma* para cada localidad (Tabla 4). Para llevar a cabo la recolecta de los individuos de éstas especies se utilizaron trampas Tomahawk (Daley, 1992; Hoogland, 1995). Estas se cebaron con diversas fuentes (avena, lechuga, girasol, plátano, vainilla y galletas) de acuerdo a Hoogland (1995). La forma en que se colocaron y distribuyeron las trampas, dentro de las zonas de estudio, dependió de una observación previa para ubicar las zonas con mayor abundancia ó presencia de individuos.

Las trampas con los organismos capturados se colocaron en una bolsa oscura, impregnada con éter, de tal manera que los organismos quedaran inmovilizados para poder obtener las muestras de tejido requeridas.

10.1.2 Colecta de Tejido

De cada individuo se tomaron pequeñas muestras de oreja de un diámetro de 3 ó 4 mm. Las muestras de oreja se cortaron usando perforadores estériles, siempre cortando en el extremo de la oreja. Los perforadores se reutilizaron, esterilizándolos con fuego y alcohol al 96°. A un organismo de *C. mexicanus* (Coah) se le recolectó tejido de corazón e hígado.

Para conservar los tejidos, éstos se colocaron en alcohol al 70% durante 10 horas; posterior a éste tiempo se conservaron en tubos con alcohol al 100%, perfectamente tapados y marcados con plumón de tinta indeleble. Las muestras se transportaron y mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización.

10.1.4 Identificación de las especies de estudio

Cynomys mexicanus. La identificación de esta especie se llevó a cabo en las localidades de recolecta, ubicando simplemente las zonas exactas de muestreo donde se localiza la especie, de acuerdo a Treviño-Villarreal y Grant (1998); además de que fue posible observar en la parte terminal de la cola, un patrón de coloración negro, lo cual es uno de los rasgos morfológicos que la distingue de *C. ludovicianus*, la otra especie perteneciente al mismo género y cuyo intervalo geográfico incluye parte del territorio nacional.

Spermophilus spilosoma pallescens. Para el reconocimiento de esta especie (y subespecie) fue necesario visualizar las imágenes obtenidas en campo y auxiliarse de diferentes medidas morfométricas (longitudes: total, de la cola vertebral, de la pinna y de la pata trasera). La identificación se llevó a cabo de acuerdo a Hall (1981).

10.2 Trabajo de laboratorio

El trabajo de laboratorio consistió en extraer el ADN total del tejido recolectado, amplificar fragmentos por la reacción en cadena de la polimerasa, purificar los productos amplificados y, a partir de este paso, se efectuó secuenciación y restricción enzimática. Los pasos se observan, de manera general, en el siguiente diagrama de flujo (Fig. 9).

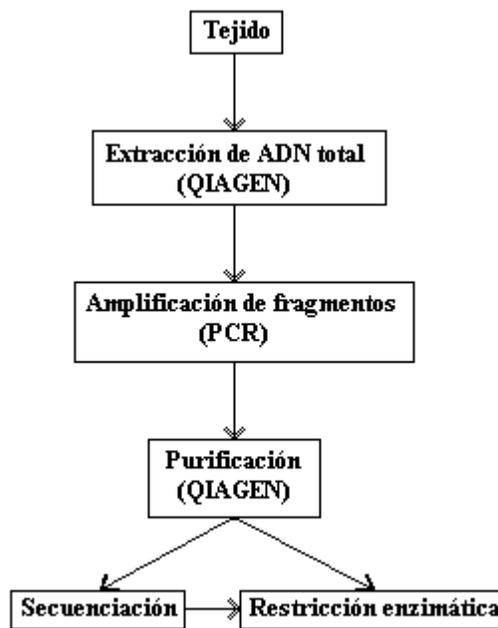


Figura 9. Esquema general del trabajo de laboratorio.

10.2.1 Extracción de ADN total.

Se utilizó tejido de oreja (cartílago-piel) y corazón de los organismos recolectados de *Cynomys mexicanus*, y tejido de oreja (cartílago-piel) de *Spermophilus spilosoma*. Previo a la extracción y para eliminar los residuos de alcohol, el tejido (aproximadamente 25 mg) se lavó con agua destilada y desionizada (15 min) a temperatura ambiente; se realizaron tres repeticiones de este lavado. La extracción de ADN total se efectuó siguiendo el procedimiento Dneasy™ Tissue Kit, QIAGEN®, USA.

10.2.2 Amplificación por PCR de las regiones mitocondriales

Debido a la carencia de información referente a cebadores específicos de *C. mexicanus* y *S. pilosoma*, la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la región control, el gen citocromo b y el gen 16S, se realizó utilizando cebadores no específicos los cuales se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores empleados para amplificar las diferentes regiones mitocondriales en *C. mexicanus* y *S. pilosoma*. TFE (Tamaño de fragmento esperado, (E) especie o grupo del cual provienen los cebadores.

Región	Cebador	Secuencias	TFE (E)	Cita
Región control (ambas especies)	L15933	5'CTCTGGTCTTGTAACCAAAAATG 3'	1054 nt <i>(Petaurista leucogenys)</i>	Oshida <i>et al.</i> (2001)
	H637	5'AGGACCAAACCTTTGTGTTTATG 3'		
Citocromo b <i>(Cynomys mexicanus)</i>	MVZ05	5'CTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3'	1140 nt (roedores)	Smith y Patton (1993)
	MVZ14	5'TCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC 3'		
Citocromo b <i>(Spermophilus pilosoma)</i>	MVZ05	5'CTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3'	800 nt (roedores)	Moritz <i>et al.</i> (1992)
	MVZ16	5'AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT 3'		
16Sr (ambas especies)	16sarL25	5'CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'	500-650 nt (vertebrados)	Palumbi <i>et al.</i> (1991)
	10			
	16sbrH3 080	5'CCGGTCTGAACTCAGATCA CGT 3'		

Para *C. mexicanus* se siguieron los procedimientos convencionales de acuerdo al protocolo del kit Taq PCR de Qiagen utilizando la enzima Taq DNA polimerasa de QIAGEN^{MR}. Las temperaturas de reacción fueron: 94° 90'', 45° 60'', 72° 90'' 1 ciclo; 94° 45'', 45° 30'', 72° 45'' 30 ciclos; 94° 45'', 45° 30'', 72° 10' 1 ciclo.

Para la especie *S. pilosoma* se utilizaron las mismas condiciones, con la única modificación de que la temperatura del anillamiento se efectuó a 40°. Los fragmentos amplificados se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% y se compararon con el marcador molecular λ ladder (2.5ng).

10.2.3 Purificación de productos de PCR.

La purificación de los productos amplificados por PCR se realizó por medio del kit QIAquick Spin (QIAGEN®, USA).

10.2.4 Secuenciación.

Se obtuvieron secuencias de la región control y del gen citocromo b, de 2 organismos de cada especie, una de cada localidad (Tabla 4). Cada muestra fue secuenciada por duplicado para verificar su autenticidad.

La secuenciación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en la Universidad de California, Berkeley y en Auburn University Genomics & Sequencing Lab (AU-GSL), usando un analizador genético ABI 3100 y un secuenciador automático ABI 377, respectivamente. Solamente se secuenció la región control y el gen citocromo b.

10.2.4.1 Edición y verificación de secuencias. Los electroferogramas de secuenciación se compararon en ambas direcciones y se alinearon, haciendo uso del algoritmo clustal, en el programa Sequence Navigator™ 1.0.1 (Applied Biosystems) de Perkin Elmer. Para verificar la autenticidad de las mismas, las secuencias compiladas se sometieron a un análisis de BLAST estándar nucleótido-nucleótido (Altschul *et al.*, 1990) en la base de datos de GenBank.

10.2.4.2 Caracterización de la región control y del gen citocromo b

Para caracterizar el fragmento de secuencia del gen citocromo b y de la región control se realizó un Blast de 2 secuencias (Tatusova y Madden, 1999), para comparar las secuencias obtenidas en este trabajo en relación con la secuencia de *Sciurus vulgaris*, con número de acceso al GenBank NC_002369, que corresponde al genoma mitocondrial completo.

Por otra parte, y debido a la ausencia de información referente a la estructura de la región control, de *C. mexicanus* y *S. spilosoma*, se optó por identificar y describir los dominios que se encuentran presentes en éstas. Para ello, se utilizaron secuencias complementarias pertenecientes a las especies *Sciurus vulgaris*, *Rattus rattus*, *Cavia porcellus* y *Mus musculus* (Larizza *et al.*, 2002). El multialineamiento se llevó a cabo con ayuda del programa Esee V. 3.1 (Cabot, 1997).

10.2.4.3 Inferencia filogenética

Grupo Externo. Para el gen citocromo b se utilizó a *Sciurus lis* (con número de acceso a GenBank, AB043881), como grupo externo, de acuerdo a Maddison *et al.* (2001) y Spradling *et al.* (2001) donde se ubica como un taxa basal a *Spermophilus*; por su parte, para la región control se eligió a *Sciurus vulgaris*, con número de acceso al GenBank NC_002369, ya que de acuerdo a Cardini (2003) se ubica como un grupo basal al género *Cynomys*. Las secuencias fueron obtenidas de GenBank (Benson *et al.*, 2002). Se utilizaron diferentes grupos externos para comparar los resultados obtenidos.

Secuencias adicionales. Para contar con un mayor sustento en los análisis de inferencia filogenética, se hizo uso de secuencias adicionales, obtenidas del GenBank, de especies pertenecientes a los géneros *Cynomys* y *Spermophilus*. Es preciso mencionar que para la región control no fue posible utilizar secuencias adicionales por falta de información en esa base de datos.

Las secuencias del gen citocromo b para las especies utilizadas y su número de acceso en GenBank son: *Cynomys ludovicianus* (AF157892), *C. leucurus* (AF157879), *C. gunnisoni* (AF157930), *C. parvidens* (AF157929), *Spermophilus brunneus* (AF157952), *S. beldingi* (AF157951), *S. columbianus* (AF157942), *S. lateralis* (AF157950), *S. madrensis* (AF157947), *S. mexicanus mexicanus* (AF157848), *S. mexicanus parvidens* (AF157853), *S. tereticaudus* (AF157941), *S. townsendii* (AF157949) y *S. washingtoni* (AF157937).

Las secuencias nucleotídicas del gen citocromo b también fueron traducidas a secuencias de aminoácidos, utilizando el código genético mitocondrial de mamíferos, con ayuda del programa Esee V. 3.1 (Cabot, 1997).

Análisis. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa PAUP Version 4.0b10 para Macintosh (Swofford, 2002). En cada caso, se obtuvo el número de caracteres constantes, parsimoniosos no-informativos (autopomorfías, simplesiomorfías y homoplasias) y parsimoniosos informativos (sinapomorfías). Los porcentajes de divergencia nucleotídica se obtuvieron basándose en los caracteres parsimoniosos informativos.

La inferencia filogenética se basó en la aplicación del método de distancia, utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (K2-p, Kimura, 1980), el cual considera tanto transiciones como transversiones; y el método de Parsimonia, el cual consiste en la elección del cladograma que implique el menor número de eventos evolutivos. Para cada uno de éstos métodos se realizaron análisis por medio de una búsqueda exhaustiva (que encuentra él o los cladogramas óptimos evaluando todos los cladogramas posibles) y un Bootstrap de 100 réplicas (que da la robustez de las ramas del árbol), para la construcción de los cladogramas. Asimismo, se llevó cabo un análisis de Máxima Verosimilitud o Probabilidad (ML, Felsenstein, 1981), que trata de evaluar la las sustituciones de acuerdo a un modelo evolutivo; en este caso, se utilizó el programa Modeltest Versión 3.0 (Posada y Crandall, 1998), que evalúa 56 Modelos para establecer el Modelo de evolución de ADN que más se adecua a los datos.

En los cladogramas obtenidos por medio del método de Parsimonia se indica la longitud (L = suma de cambios nucleotídicos a lo largo de las ramas del cladograma), el índice de consistencia (IC = estima de la cantidad de sinapomorfias y por tanto del grado de homoplasia), índice de homoplasia (IH = mide el grado de homoplasia) e índice de retención (IR = reduce el sesgo debido a la autopomorfia).

10.2.5 Restricción enzimática

Para tener un conocimiento más amplio acerca de las enzimas y sitios de restricción informativos para detectar el nivel de variabilidad genética, se siguieron dos procedimientos: el primero basado en secuencias obtenidas a partir del GenBank, y el segundo en base a las secuencias obtenidas en el presente estudio.

10.2.5.1 Sobre la base de secuencias obtenidas del GenBank. Para la región control, el gen citocromo b y el gen 16S, se buscaron dentro del GenBank (Benson *et al.*, 2002), las secuencias de dos individuos diferentes de taxa cercanos a las especies de estudio (ver apartados de enzimas de restricción para cada gen). Una vez localizadas las secuencias, se realizó un alineamiento entre las secuencias de cada especie con ayuda del programa Blast de 2 Secuencias (Tatusova y Madden, 1999). Finalmente, las secuencias alineadas fueron analizadas utilizando el programa NEBcutter V.2.0 (Roberts y Macelis, 2001; Vincze *et al.*, 2003), que permitió conocer a aquellas enzimas que reconocen secuencias específicas de 4 y 5 nucleótidos y que pudieran ser informativas para determinar niveles de variabilidad genética.

Región control. Para esta región, hasta el momento no se cuenta con secuencias de ninguna de las especies de estudio, por lo cual se buscaron patrones de restricción en base a las secuencias obtenidas para una especie de la misma familia (*Petaurista leucogenys*). La única endonucleasa que resultó informativa en una secuencia de 1051 nt se muestra a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Enzimas y patrones de corte para 2 individuos de *Petaurista leucogenys* con la enzima Rsa I. Entre paréntesis se indica el número de acceso al GenBank.

<i>Petaurista leucogenys</i>		
	Individuo 1 (AB043815)	Individuo 2 (AB043799)
Enzima	Longitud Esperada	Longitud Esperada
Rsa I (5'-GT↓AC-3')	523	523
	203	203
	168	118
	118	88
	20	79
	19	20
		19

Gen citocromo b. Para este gen se analizaron las secuencias de 1140 nt de dos individuos de *Cynomys mexicanus* (Tabla 7), y de la misma forma que para la región control la enzima Rsa I fue la única que presentó diferencias en los patrones de corte por lo cual se consideró a ésta como una endonucleasa intra-específica informativa en el gen citocromo b. Para *Spermophilus pilosoma* no se encontraron secuencias de este gen en el GenBank.

Tabla 7. Enzimas y patrones de corte para 2 individuos de *Cynomys mexicanus* con la enzima Rsa I. Entre paréntesis se indica el número de acceso al GenBank.

<i>Cynomys mexicanus</i>		
	Individuo 1 (AF157847)	Individuo 2 (AF157841)
Enzima	Longitud Esperada	Longitud Esperada
Rsa I (5'-GT↓AC-3')	669	471
	471	346
		323

ARNr 16S. Para este gen no hay secuencias de las especies de estudio ó taxonómicamente cercanas dentro del GenBank, y sólo existe información de algunas especies de la misma familia y de un individuo por especie (e.g., *Tamias bulleri* con número de acceso al GenBank AF147679). Por ello, en base a los resultados obtenidos en el Blast realizado para la región control y el gen citocromo b (Tablas 6 y 7 respectivamente), se utilizó la enzima Rsa I para verificar la presencia de polimorfismo.

10.2.5.2 Sobre la base de las secuencias obtenidas en este estudio. En este estudio y a partir de las secuencias obtenidas para la región control y el gen citocromo b, en el Anexo I se muestran las enzimas que resultaron informativas a nivel intra-específico e inter-genérico para determinar niveles de variabilidad genética.

10.2.5.3 Condiciones de la restricción enzimática. Las reacciones de restricción se llevaron a cabo conforme a las condiciones especificadas por los fabricantes (New England, BioLabs_{Inc}).

10.2.5.4 Análisis de los patrones de restricción. Los perfiles generados a partir de la restricción con la enzima Rsa I fueron analizados y los tamaños de cada fragmento se verificaron con el programa DNAfrag version 3.03 (Nash, 1991) que calcula el tamaño de los fragmentos de restricción (medida en mm) usando el algoritmo de Schaffer y Sederoff (1981).

11. RESULTADOS

11.1 Extracción de ADN total

Las extracciones de ADN total obtenidas en el laboratorio fueron de un alto peso molecular (Figs. 10 y 11); la λ ladder utilizada fue SM0241 100pb Gene Ruler™.

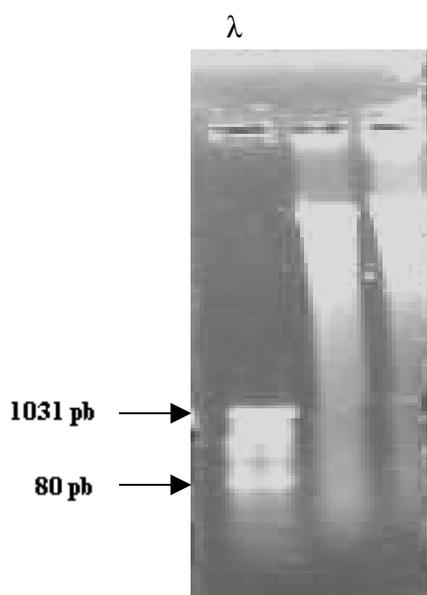


Figura 10. ADN total de tejido de oreja de *C. mexicanus* (El Manantial, SLP).

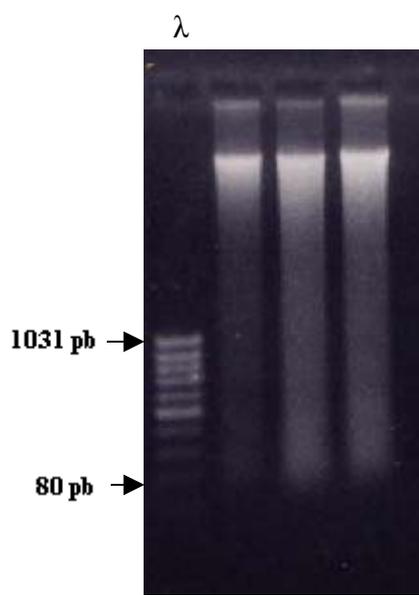


Figura 11. ADN total de tejido de oreja de *S. spilosoma* (El Gallo, SLP).

11.2 Purificados a partir de los productos amplificados

11.2.1 Citocromo b

Para la especie *C. mexicanus* se amplificaron productos de 1160 nt, mientras que para *S. spilosoma* los productos fueron de 880 nt aproximadamente (Fig. 12); se utilizaron cebadores diferentes para cada especie (Tabla 5); la λ ladder empleada fue SM0241 100pb Gene Ruler™.

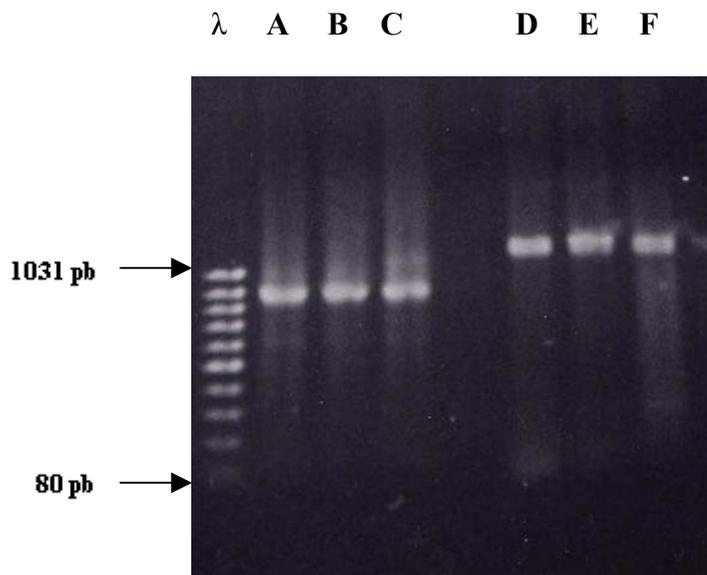


Figura 12. Purificados de los fragmentos del gen citocromo b. A – C corresponden a *S. spilosoma*, y D – F, pertenecen a *C. mexicanus*.

11.2.2 Región Control

Para *C. mexicanus* y *S. spilosoma* se amplificaron productos de 1140 nt, aproximadamente (Fig. 13); λ ladder SM0241 100pb Gene Ruler™.

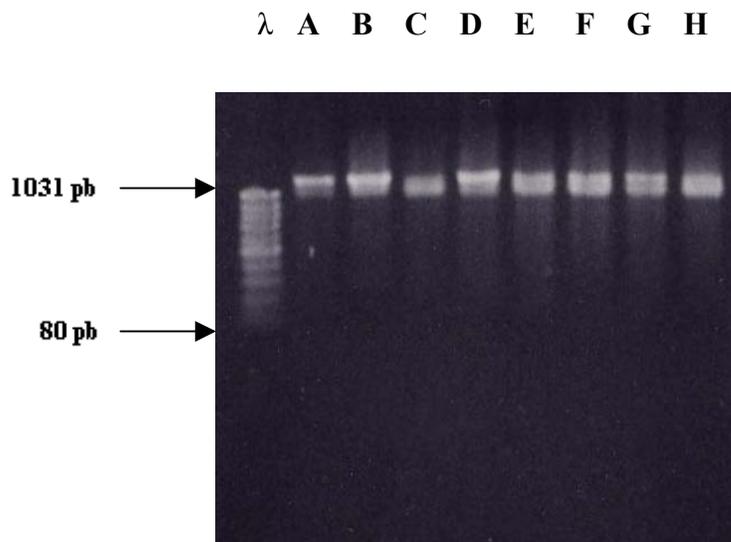


Figura 13. Purificados de los fragmentos de la región control. A – D corresponden a *S. spilosoma*, y E – H pertenecen a *C. mexicanus*.

11.2.3 ARNr 16S

Para *C. mexicanus* y *S. spilosoma* se amplificaron productos de 600 nt, aproximadamente (Fig. 14); λ ladder SM0241 100pb Gene Ruler™.

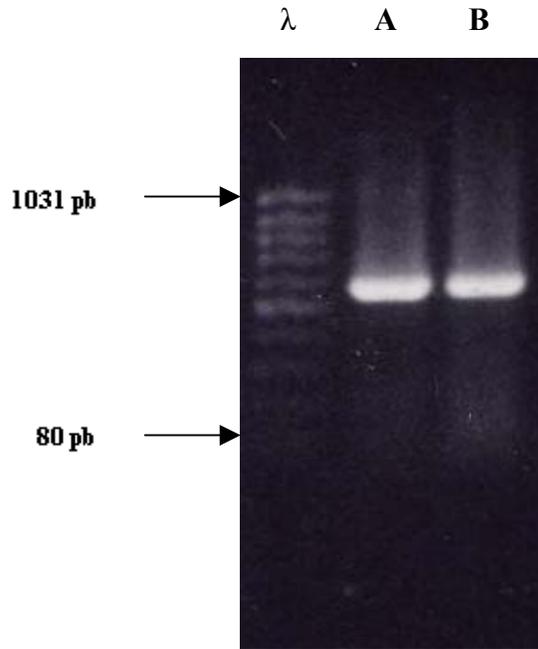


Figura 14. Purificados del gen 16S. A. Corresponde a *C. mexicanus* de Coahuila. B. Corresponde a *S. spilosoma* de Coahuila.

11.3 Caracterización de la región control y del gen citocromo b

11.3.1 Citocromo b. A partir de los productos amplificados se obtuvo una secuencia de 713 nucleótidos (237 aminoácidos) para *C. mexicanus* y *S. spilosoma*, que representa el 62.5% del gen completo en relación con *Sciurus vulgaris* (con número de acceso al GenBank NC_002369); su inicio corresponde a la posición 37 de nt (13 de aminoácidos - Isoleucina) y finaliza en la posición 750 nucleotídica (Fig. 15 y Anexo II, III y IV).

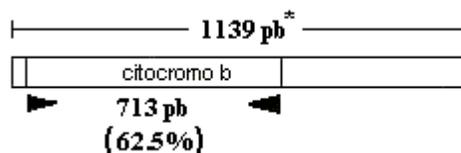


Figura 15. Fragmento de la secuencia del gen citocromo b con el cual se trabajó. *Tamaño de la secuencia del gen citocromo b completo para *Sciurus vulgaris*.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas para los taxa de estudio, éstas se alinearon y compararon, tomando a *S. pilosoma* de Coahuila como referencia para observar los cambios entre ellas, y los resultados indican, a nivel intra-específico e inter-genérico, una mayor cantidad de cambios en las transiciones (TS) que en las transversiones (TV); la tasa (TS/TV) a nivel intra-específico fue de 8, y a nivel inter-genérico se presentó una tasa promedio de 9.1 (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de transiciones, transversiones, tasa TS/TV, deleciones e inserciones entre las especies de estudio con respecto a *S. pilosoma* de Coahuila.

<i>S. pilosoma</i> (Coah)	Transiciones (TS)	Tranversiones (TV)	Tasa (TS/TV)	Deleciones	Inserciones
<i>S. pilosoma</i> (SLP)	1.12%	0.14%	8	0%	0%
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	7.71%	0.84%	9.2	0%	0%
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	7.57%	0.84%	9.0	0%	0%

11.3.2 Región control. Se obtuvo una secuencia de 1062 nt para *C. mexicanus* y de 1063-4 nt para *S. pilosoma* que representan aproximadamente el 90% de la región completa, en relación con la secuencia del gen completo de *Sciurus vulgaris* (con número de acceso al GenBank NC_002369) de 1059 nt (Fig. 16).

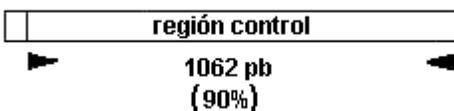


Figura 16. Se indica el tamaño del fragmento secuenciado de la región control y entre paréntesis el porcentaje, tomando como comparación la secuencia de *S. vulgaris*. El recuadro inicial corresponde al fragmento no conseguido al secuenciar.

En la Tabla 9 se presenta la longitud de la región control de diversas especies de roedores, incluyendo las especies de estudio.

Tabla 9. Longitud de la región control de diversas especies de roedores.

Linaje	Longitud (nt)
Orden Rodentia	
Familia Sciuridae	
<i>Cynomys mexicanus</i> ¹	1062
<i>Spermophilus spilosoma</i> ¹	1063-4
<i>Sciurus vulgaris</i> *	1059
Familia Muridae	
<i>Rattus rattus</i> *	920
<i>Mus musculus</i> *	878
Familia Caviidae	
<i>Cavia porcellus</i> *	1341

¹ Este estudio, * Datos obtenidos de Larizza *et al.* (2002).

La región control, en roedores, está caracterizada por presentar 3 dominios característicos: dominio ETAS (extended termination-associated sequence, de sus siglas en inglés), el dominio central y dominio CSB (conserved sequence block, de sus siglas en inglés) (Fig. 17). En *C. mexicanus* y *S. spilosoma* el análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas mostró la misma estructuración, careciendo sólo de la parte inicial del dominio ETAS (Fig 16; Anexo V).

En la Figura 17 se presenta el esquema general de la estructura de la región control de las especies de estudio comparadas con la de otras especies de roedores analizadas por Larizza *et al.* (2002). Se observa que la estructura general de *C. mexicanus* y *S. spilosoma* es similar, ya que ambas presentan el bloque ETAS1, el CD y el bloque CSB1, sin embargo cabe resaltar que en contraste con otras especies de roedores analizadas, las especies del presente estudio no presentan secuencias de repetición cortas o largas y tampoco los bloques conservados ETAS2, CSB2 y CSB3.

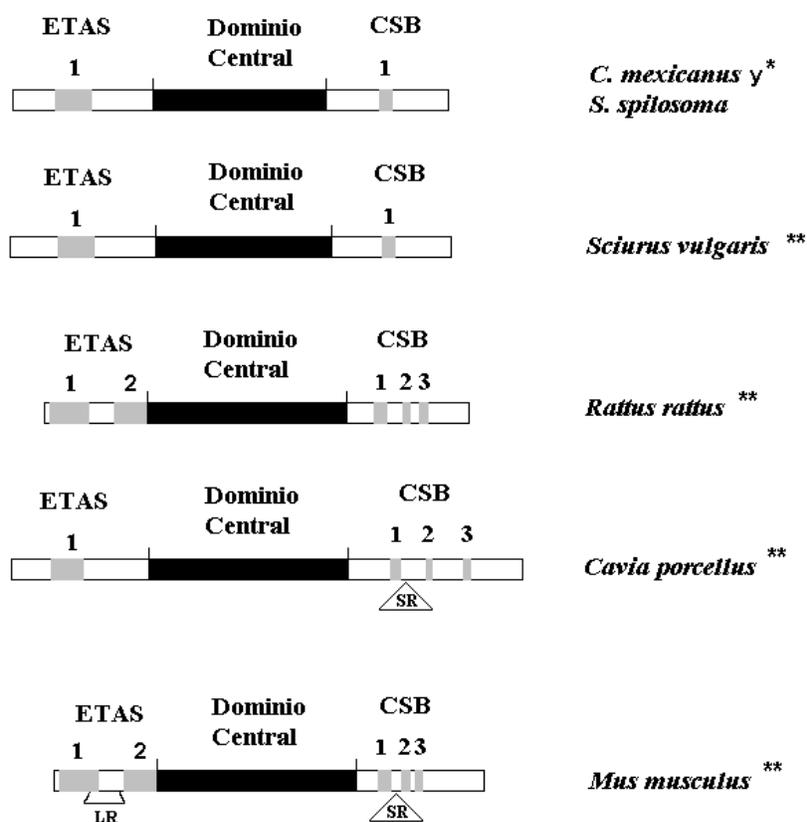


Figura 17. Esquema general de la estructura de la región control de varias especies de roedores. Se presentan los 3 dominios característicos de mamíferos (ETAS, dominio central y CSB); las áreas en negro o gris corresponden a las regiones con alta similitud al realizar un multialineamiento; las áreas blancas representan las regiones con alta divergencia; los números indican bloques de secuencias conservadas; LR, repeticiones largas; SR, repeticiones cortas. * Este estudio. ** Datos obtenidos de Larizza *et al.* (2002).

Posterior a esto, las secuencias nucleotídicas de los taxa de estudio, éstas se alinearon y compararon, tomando a *S. pilosoma* de Coahuila como referencia para observar los cambios entre ellas; los resultados indican una mayor cantidad de cambios en las transiciones (TS) que en las transversiones (TV) a nivel intra-específico e inter-genérico; la tasa (TS/TV) a nivel intra-específico fue de 5.1, y a nivel inter-genérico se presentó una tasa promedio de 1.9 (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de transversiones, transiciones, deleciones e inserciones entre las especies de estudio con respecto a *S. pilosoma* de Coahuila.

<i>S. pilosoma</i> (Coah)	Transiciones	Tranversiones	Tasa (TS/TV)	Deleciones	Inserciones
<i>S. pilosoma</i> (SLP)	0.46%	0.09%	5.1	0%	0.09%
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	6.95%	3.66%	1.9	0.47%	0.65%
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	6.86%	3.66%	1.9	0.47%	0.65%

A continuación se presenta la caracterización de los tres dominios de la región control de *C. mexicanus* y *S. pilosoma*; se incluye a *Sciurus vulgaris* por tratarse de un grupo taxonómicamente cercano a éstas y del cual se cuenta con información al respecto en Larizza *et al.* (2002).

11.3.2.1 Dominio ETAS

El multialineamiento del dominio ETAS de *C. mexicanus* y *S. pilosoma* comparado con *Sciurus vulgaris* se presenta en la Fig. 18. En las especies del presente estudio, la longitud parcial del dominio ETAS es de 366nt para *C. mexicanus* y 367nt para *S. pilosoma*. El número de sitios variables intra-específicos para *S. pilosoma* fue de 3 nt (0.5% TS, 0.3% TV, con una tasa TS/TV de 2, no se presentan deleciones e inserciones) y nula para *C. mexicanus*; a nivel inter-genérico, entre *C. mexicanus*-*S. pilosoma*, se presentaron 56 sustituciones (7.2%

TS, 7.0% TV y una tasa de TS/TV de 1.04%), además de presentó un 0.8% de deleciones/inserciones.

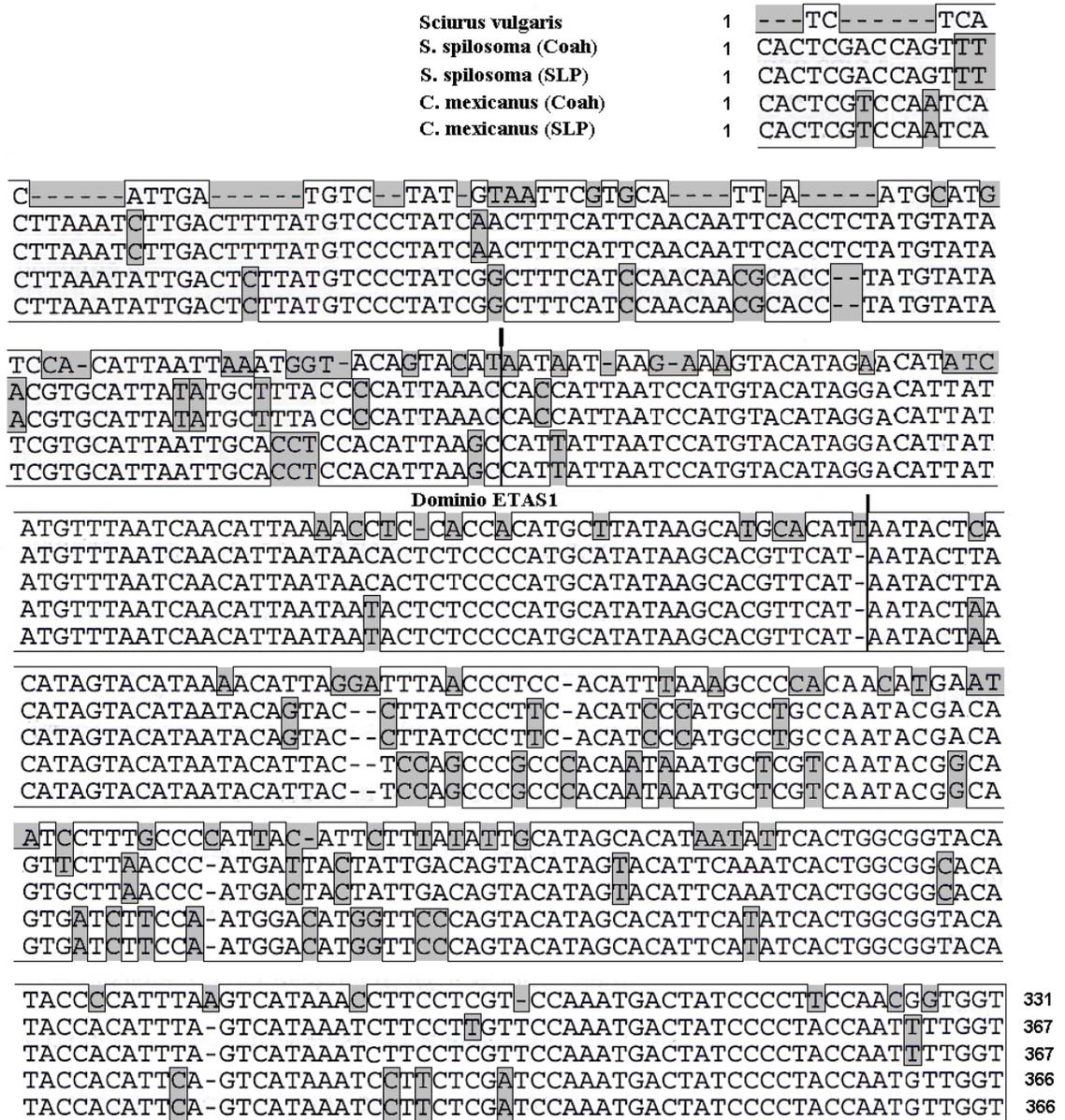


Figura 18. Multialineamiento del dominio ETAS. En gris se presentan los nucleótidos que difieren entre las secuencias. En el recuadro, entre las posiciones 105 y 186, se presenta el bloque conservado ETAS1.

El porcentaje de similitud nucleotídica a nivel inter-genérico fue de 65.9% y 63.5% entre *S. vulgaris* vs *C. mexicanus* y *S. pilosoma* respectivamente, mientras que entre éstos dos últimos fue de 82.8%. A nivel intra-específico, para *C. mexicanus* el porcentaje fue del 100% y para *S. pilosoma* fue de 99.2%, con tres sustituciones en las posiciones 252, 266 y 336.

11.3.2.2 Dominio Central

El multialineamiento del dominio central de *C. mexicanus* y *S. pilosoma* comparado con *Sciurus vulgaris* se presenta en la Figura 19. Las variaciones observadas en la longitud de este dominio para las diferentes especies se deben a 4 inserciones/deleciones en las posiciones 72, 243, 244 y 251. *C. mexicanus* de San Luis Potosí y Coahuila presenta una longitud de 315 nucleótidos, mientras que *S. pilosoma* presenta 317 nt. *Sciurus vulgaris* presenta una longitud de 317 nucleótidos. El número de sitios variables intra-específicos para *S. pilosoma* fue de 4 nt (0.9% TS, 0% TV, con una tasa TS/TV de 3 y 0.3% deleciones/inserciones) y para *C. mexicanus* se presentó 1 transición en la posición 135. A nivel inter-genérico, entre *C. mexicanus*-*S. pilosoma*, se presentaron 9 sustituciones (2.2% TS, 0.6% TV y una tasa de TS/TV de 3.5) en las posiciones 45, 46, 93, 95, 100, 135, 136, 140 y 302, y 2 deleciones/inserciones en las posiciones 72 y 243.

El porcentaje de similitud nucleotídica a nivel inter-genérico es alto, por ejemplo entre *S. vulgaris* y los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* el porcentaje fue mayor al 87%; asimismo, y entre los dos géneros de estudio fue mayor al 98%; lo mismo sucede a nivel intra-específico, para *C. mexicanus* resultó de 99.7% y para *S. pilosoma* fue de 98.7%.

Sciurus vulgaris 1 CTCCTTAATCTACCTACCTCCGTGAAAATCATCAACCGCCCGATAACGTGTCCCTCT
S. pilosoma (Coah) 1 CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACTTAAATGTCCCTCT
S. pilosoma (SLP) 1 CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACTTAAATGTCCCTCT
C. mexicanus (Coah) 1 CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACTCCGTGTCCCTCT
C. mexicanus (SLP) 1 CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACTCCGTGTCCCTCT

TCTCGCCTGGATCCCAATTAACTTGGGGGTGACTAACTATGCTCTTTGACAGGCATCTG
 TCTTGCTCTGATCCCAATTTAACTTGGGGGTAGCTAAATAGTGATCTTTATCTGGCATCTG
 TCTTGCTCTGATCCCAATTTAACTTGGGGGTAGCTAAATAGTGATCTTTATCTGGCATCTG
 TCTTGCTCTGATCCCA-TTTAACTTGGGGGTAGCTAACAATGATCTTTATCTGGCATCTG
 TCTTGCTCTGATCCCA-TTTAACTTGGGGGTAGCTAACAATGATCTTTATCTGGCATCTG

GTTCCTACCTCAGGGCCATGTAATGCGTTATCGCCCAATACGTTCCCCTTAAATAAGACAT
 GTTCCTACCTCAGGGCCATGAACTTCATAATCGCCCAACCGTTCCCCTTAAATAAGACAT
 GTTCCTACCTCAGGGCCATGACTTCATAATCGCCCAACCGTTCCCCTTAAATAAGACAT
 GTTCCTACCTCAGGGCCATAAACTGCATAATCGCCCAACCGTTCCCCTTAAATAAGACAT
 GTTCCTACCTCAGGGCCATGAACTGCATAATCGCCCAACCGTTCCCCTTAAATAAGACAT

CACGATGGATTAGTTCATTCTAGCCCGTGACCCAACATAACTGCCTGTGCATGCCTTTA
 CACGATGGATTAGTTCATTCTAGCCCGTGACCCAACATAACTGCCTGTGCATGCCTTTA
 CACGATGGATTAGTTCATTCTAGCCCGTGACCCAACATAACTGCCTGTGCATGCCTTTA
 CACGATGGATTAGTTCATTCTAGCCCGTGACCCAACATAACTGCCTGTGCATGCCTTTA
 CACGATGGATTAGTTCATTCTAGCCCGTGACCCAACATAACTGCCTGTGCATGCCTTTA

GTGGTTTTTATTTTTTGGGGTATGCTTCCACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCGACCGC
 GTGGTTTTT-ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC
 GTGGTTTTT-ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC
 GTGGTTTTT-ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC
 GTGGTTTTT-ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC

AGTCAAATTCAAATGTAGCTGGAC 317
 ATTCAACTCAATGTAGCTGGAC 317
 ATTCAAATTCAAATGTAGCTGGAC 317
 ATTCAACTCAATGTAGCTGGAC 315
 ATTCAACTCAATGTAGCTGGAC 315

Figura 19. Multialineamiento del dominio central. En gris se presentan los cambios nucleotídicos entre las secuencias.

11.3.2.3 Dominio CSB

El multialineamiento del dominio CSB de *C. mexicanus* y *S. pilosoma* comparado con *Sciurus vulgaris* se presenta en la Figura 20. La longitud de este dominio para *S. vulgaris* fue de 354nt; para *S. pilosoma* de Coahuila fue de 381nt y para SLP de 379nt; *C. mexicanus* presentó 381nt. A nivel intra-específico, para *S. pilosoma* solo se presentó 1 inserción/delección en la posición 146, mientras que para *C. mexicanus* fue nulo. A nivel inter-genérico, entre *C. mexicanus*-*S. pilosoma*, se presentaron 52 sustituciones (10% TS, 3.3% TV y una tasa de TS/TV de 11.8%), asimismo se presentaron 7 delecciones/inserciones en las posiciones 30, 145, 146, 158, 210, 245 y 338.

Como en el caso del dominio ETAS, el porcentaje de similitud nucleotídica a nivel de nucleótidos es variable. Entre *S. vulgaris* y los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* el porcentaje resultó alto, 53.5% y 54.7%, respectivamente, es decir, prácticamente el doble de divergencia que el encontrado en el dominio ETAS. Por su parte, entre los dos géneros *Cynomys* y *Spermophilus*, el porcentaje resultó mayor al encontrado en ETAS (84.7-84.9%). De la misma forma, a nivel intra-específico el porcentaje fue alto, para *C. mexicanus* fue del 100% y para *S. pilosoma* resultó de 97.7%.

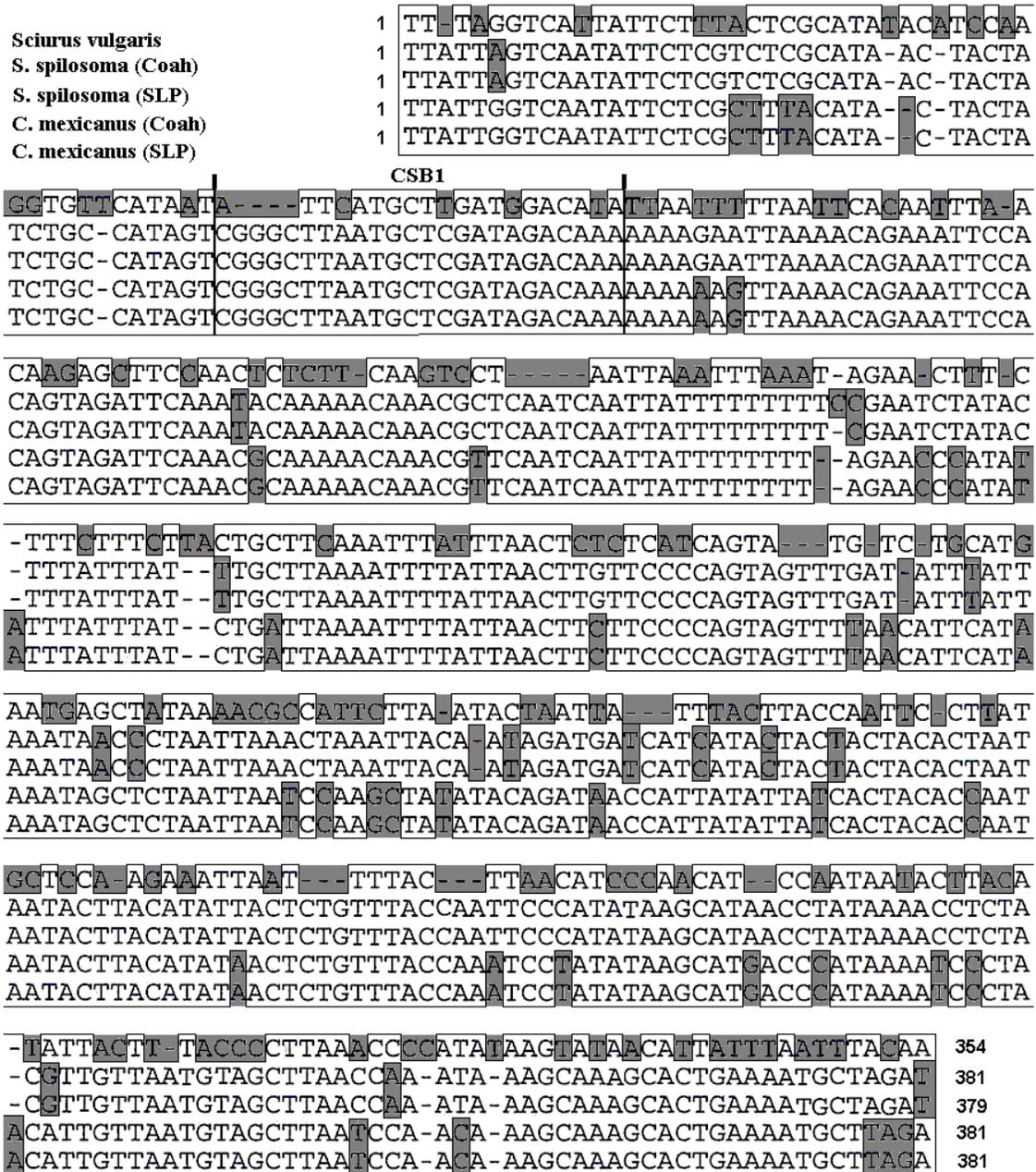


Figura 20. Multialineamiento del dominio CSB. En gris se presentan los nucleótidos que difieren entre las secuencias. En el recuadro, entre las posiciones 50 y 73, se presenta el bloque conservado CSB1.

11.4 Inferencia filogenética

11.4.1 Gen Citocromo b

El fragmento analizado para las especies objeto de estudio y el grupo externo fue de 713 nt del gen citocromo b, dicha secuencia mostró 528 posiciones constantes, 124 se comportaron como caracteres parsimoniosos no informativos, y 61 fueron caracteres informativos de parsimonia.

En este análisis, se obtuvo 0% de divergencia nucleotídica intra-específica en *C. mexicanus* y 0.3% en *S. pilosoma* a divergencia nucleotídica. El porcentaje de divergencia inter-genérico (*Cynomys* y *Spermophilus*) resultó alto (8.2-8.5%) con respecto a la divergencia intra-específica; de la misma manera, el porcentaje de divergencia entre éstos dos últimos géneros con respecto a *Sciurus lis* resultó alto (5.0-5.4%) (Tabla 11).

Tabla 11. Divergencia nucleotídica para el gen citocromo b entre las especies de estudio (*C. mexicanus* y *S. pilosoma*), así como del grupo externo (*Sciurus lis*).

Relaciones	Divergencia Nucleotídica	Relaciones	Divergencia Nucleotídica
<i>S. lis</i> vs <i>C. mexicanus</i> (Coah)	5.0%	<i>S. lis</i> vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	5.0%
<i>S. lis</i> vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	5.4%	<i>S. lis</i> vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	5.3%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	8.2%	<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	8.4%
<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	8.4%	<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	8.5%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	0.0%	<i>S. pilosoma</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	0.3%

Las topologías obtenidas para la secuencia del gen citocromo b con el análisis de Distancia (utilizando el modelo de dos Parámetros de Kimura), de Parsimonia (ambos por medio de una búsqueda exhaustiva) y de Máxima Probabilidad fueron consistentes, en donde se ubica a *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma* como dos grupos monofiléticos y a *Sciurus lis* como grupo externo (Fig. 21).

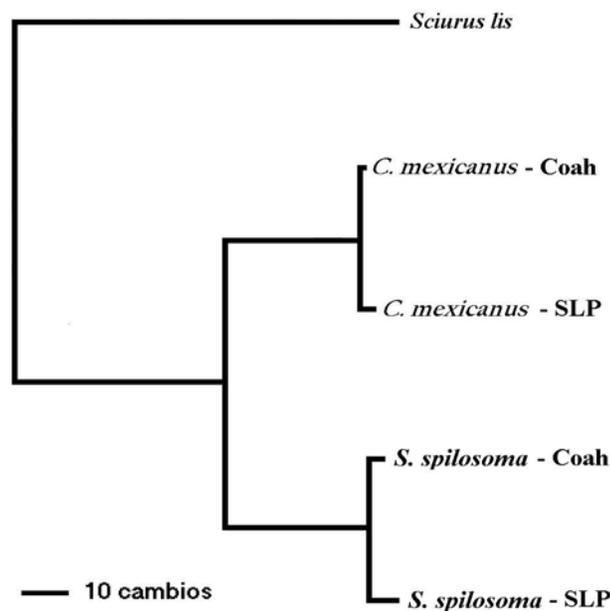


Figura 21. Topología consenso basada en la secuencia del gen citocromo b y obtenida con los análisis de Distancia, Parsimonia (Longitud del árbol (L) = 203, Índice de Consistencia (IC) = 0.9951, Índice de Homoplasia (IH) = 0.0049, Índice de Retención (IR) = 0.9836) y Máxima Probabilidad.

Por otro lado, comparando las secuencias del gen citocromo b de *C. mexicanus* y *S. spilosoma* con las secuencias obtenidas del GenBank de las especies *C. ludovicianus*, *C. gunnisoni*, *C. parvidens* y *C. leucurus*, se encontró que mediante los análisis de Distancia y de Parsimonia (Fig. 22), los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* se ubican como grupos monofiléticos; asimismo, dentro del género *Cynomys* encontramos dos grupos, uno formado por *C. mexicanus* y *C. ludovicianus*, y otro constituido por *C. gunnisoni*, *C. parvidens*, *C. leucurus*.

Sin embargo, los análisis de Máxima Probabilidad (Fig. 23) indican la presencia de dos clados, uno formado por *C. mexicanus* y *C. ludovicianus*, y otro formado por *C. gunnisoni*, *C. parvidens*, *C. leucurus* y *S. spilosoma*, lo que nos indica que los miembros del género *Cynomys* se comportan como un grupo parafilético.

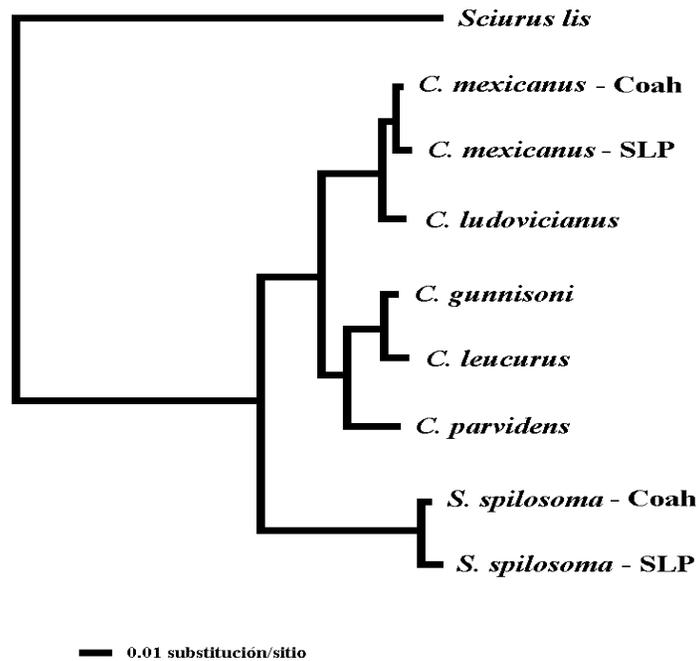


Figura 22. Cladograma basado en la secuencia del gen citocromo b y obtenido con el análisis de Distancia y Parsimonia (L = 251, IC = 0.8805, IH = 0.1195, IR = 0.7902), utilizando un análisis de búsqueda exhaustiva.

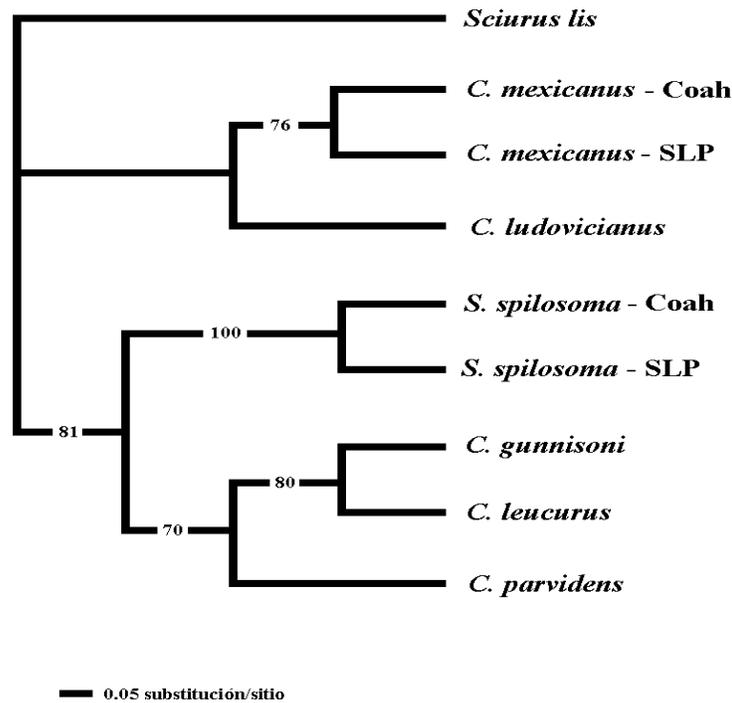


Figura 23. Cladograma basado la secuencia del gen citocromo b y obtenido con el método de Máxima Probabilidad, utilizando bootstrap.

Por su parte, con la finalidad de dilucidar la posible parafilia del género *Cynomys*, se realizó un análisis con secuencias adicionales provenientes del GenBank de los géneros *Cynomys* (*C. ludovicianus*, *C. leucurus*, *C. gunnisoni*, *C. parvidens*) y *Spermophilus* (*S. brunneus*, *S. beldingi*, *S. columbianus*, *S. lateralis*, *S. madrensis*, *S. mexicanus mexicanus*, *S. mexicanus parvidens*, *S. tereticaudus*, *S. townsendii* y *S. washingtoni*) del mismo gen. Los resultados mostraron que de los 713 caracteres analizados, 447 fueron caracteres constantes, 76 caracteres parsimoniosos no informativos, y 190 fueron caracteres parsimoniosos informativos.

La divergencia nucleotídica que resultó entre las diferentes especies y géneros se muestra en la Tabla 12, encontrándose una baja divergencia intra-específica en *C. mexicanus* (0.14%) y *S. spilosoma* (0.98%); ésta resultó alta (8.0-9.3%) a nivel inter-genérico (*C.*

mexicanus-S. pilosoma). Comparando los resultados con los de la Tabla 11, observamos que las relaciones son similares en el sentido de obtener baja divergencia intra-específica y alta divergencia inter-genérica.

Los mayores porcentajes de divergencia se obtuvieron en las relaciones de las especies de estudio con respecto al grupo externo, en este caso *Sciurus lis* (16.3-16.7%); las divergencias inter-específicas del género *Cynomys* estuvieron en el intervalo de 0.84-4.8%, considerándolas altas si las comparamos con la relación intra-específica de *C. mexicanus* (0.14%), la única excepción que presentó un bajo porcentaje de divergencia fue la relación de *C. mexicanus-C. ludovicianus* (0.84%). Por su parte, los porcentajes de divergencia inter-específica del grupo de *Spermophilus* resultaron altos (7.7-15%); cabe destacar que la divergencia entre *S. pilosoma* con algunas especies del mismo género fue alta, como en los casos de *S. pilosoma-S. washingtoni* (11.6%) y *S. pilosoma-S. madrensis* (15.0%), dichas divergencias inclusive resultaron mayores que comparando a *S. washingtoni* y *S. madrensis* con *C. mexicanus* (10.9% y 14.4%, respectivamente), siendo que ésta última especie pertenece al género *Cynomys*.

Tabla 12. Divergencia nucleotídica en el gen citocromo b entre las especies de estudio (*C. mexicanus* y *S. pilosoma*), el grupo externo (*Sciurus lis*), y secuencias complementarias de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus*.

Relaciones	Divergencia Nucleotídica	Relaciones	Divergencia Nucleotídica
<i>Sciurus lis</i> vs <i>C. mexicanus</i> (Coah)	16.3%	<i>Sciurus lis</i> vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	16.7%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	0.14%	<i>S. pilosoma</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	0.98%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. ludovicianus</i>	0.84%	<i>S. pilosoma</i> (Coah) vs <i>C. ludovicianus</i> (Coah)	8.4%

<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. leucurus</i>	4.8%	<i>S. spilosoma</i> (Coah) vs <i>C. leucurus</i>	9.3%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. parvidens</i>	4.2%	<i>S. spilosoma</i> (Coah) vs <i>C. parvidens</i>	9.1%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. tereticaudus</i>	9.1%	<i>S. spilosoma</i> (Coah) vs <i>S. tereticaudus</i>	7.7%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. mexicanus mexicanus</i>	8.6%	<i>S. spilosoma</i> (Coah) vs <i>S. mexicanus mexicanus</i>	9.5%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. washingtoni</i>	10.9%	<i>S. spilosoma</i> (Coah) vs <i>S. washingtoni</i>	11.6%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. madrensis</i>	14.4%	<i>S. spilosoma</i> (Coah) vs <i>S. madrensis</i>	15.0%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. spilosoma</i> (Coah)	8.0%	<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. spilosoma</i> (SLP)	9.3%

En la Figura 24 se presenta la topología obtenida con el análisis de Distancia (utilizando el modelo de dos Parámetros de Kimura). En este análisis, se reconocen cuatro grupos principales. *S. lateralis* y *S. madrensis* forman su propio clado, además de que se comportan como un grupo basal del resto de las especies, exceptuando al grupo externo.

Un segundo clado, constituido por las especies *Spermophilus brunneus*, *S. townsendii*, *S. beldingi*, *S. columbianus* y *S. washingtoni*, no obstante algunos de los miembros de este clado (*S. beldingi* y *S. columbianus*) forman una politomía no resuelta.

El tercer clado está conformado sólo por las dos subespecies de *S. mexicanus*. El último clado lo conforman la mayoría de las especies, incluyendo a las especies de estudio. Por un lado, *C. mexicanus* se ubica como grupo hermano de *C. ludovicianus* lo que concuerda con el bajo porcentaje de divergencia nucleotídico entre ambas presentado en la tabla 12. A su vez, estas especies forman un grupo hermano con *C. gunnisoni*, *C. leucurus* y *C. parvidens*. Por otro lado, *S. spilosoma* se encuentra estrechamente relacionado a *S. tereticaudus*, y ambos se ubican como un grupo hermano a las especies del género *Cynomys*, por lo que cabe resaltar que *S. spilosoma* y *S. tereticaudus* se comportan como un grupo polifilético con respecto a las otras especies del género *Spermophilus*.

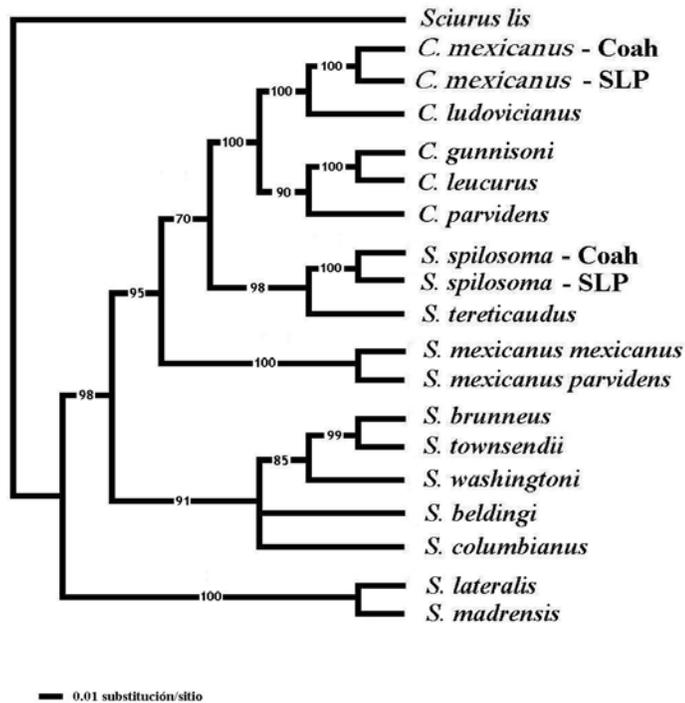


Figura 24. Topología basada en la secuencia del gen citocromo b y generado con el método de Distancia, utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura.

El análisis de Parsimonia presentado en la Figura 25, nos muestra una topología similar al presentado en el análisis de Distancia, sin embargo existen algunas diferencias. Por un lado, la topología difiere en el hecho de que solamente se reconocen 3 grupos principales debido a que el tercer clado presentado en el análisis de distancia, constituido por las subespecies de *S. mexicanus*, en este caso se encuentra formando una politomía con las especies del cuarto clado del mismo análisis (*C. mexicanus*, *C. ludovicianus*, *C. gunnisoni*, *C. leucurus*, *C. parvidens*, *Spermophilus spilosoma* y *S. tereticaudus*); se mantiene la polifilia. Por otro lado, a la politomía formada por *S. beldingi* y *S. columbianus* dentro del segundo clado, se añade *S. washingtoni*. Estas politomías probablemente no se resuelven con este método por tratarse de un análisis de mínima evolución (búsqueda del árbol con el menor número de cambios nucleotídicos).

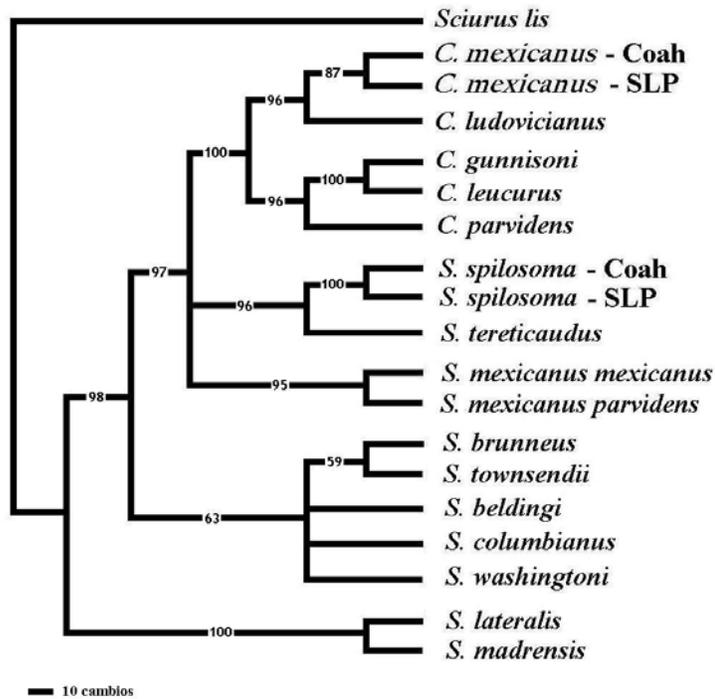


Figura 25. Topología generada con el análisis de Parsimonia de la secuencia del gen citocromo b (L = 646, IC = 0.5341, IH = 0.4659, IR = 0.5877).

La topología del análisis de Máxima Probabilidad (Fig. 26), por medio de un análisis heurístico, es similar a la topología del análisis de distancia (Fig. 24), presentando asimismo cuatro grupos principales. La única diferencia la encontramos en el segundo clado ya que en este análisis no existe politomía alguna. En este caso, *S. columbianus* se presenta como un taxón basal de *S. beldingi*, el cual a su vez es basal a *S. washingtoni* y éste es ancestral al grupo formado por *S. brunneus* y *S. townsendii*. Asimismo, conforme las dos Figuras anteriores, con este análisis se mantiene la polifilia en el tercer y cuarto clado.

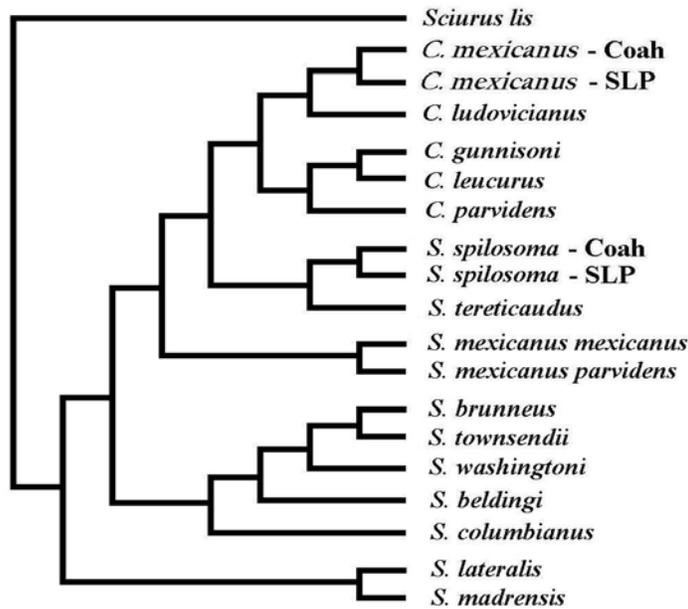


Figura 26. Máxima Probabilidad de la secuencia del gen citocromo b a través de un análisis heurístico.

Para conocer si existen cambios en las relaciones filogenéticas al emplear secuencias nucleotídicas y secuencias de aminoácidos se efectuó un análisis a nivel de aminoácidos con las especies de estudio y el grupo externo. Para ello, se analizó una secuencia de 237 aminoácidos para el gen citocromo b, de los cuales 224 permanecieron constantes, 4 se comportaron como caracteres parsimoniosos no informativos, y 9 fueron caracteres “informativos” de parsimonia.

En la Tabla 13 se presenta la divergencia a nivel de aminoácidos, donde se indica nula divergencia intra-específica en *C. mexicanus* y baja en *S. spilosoma* (0.004%). En general, la divergencia entre *C. mexicanus*-*S. spilosoma* se mantuvo alta (3.4-3.8%). Lo mismo sucedió con las divergencias entre *Sciurus lis* y *C. mexicanus* (3.8%), no obstante resalta el hecho de obtener una baja divergencia a nivel de aminoácidos entre *S. lis* y *S. spilosoma* (0.0-0.004%).

Tabla 13. Divergencia de aminoácidos en el gen citocromo b entre las especies de estudio (*C. mexicanus* y *S. spilosoma*), así como del grupo externo (*Sciurus lis*).

Relaciones	Divergencia de Aminoácidos	Relaciones	Divergencia de Aminoácidos
<i>S. lis</i> vs <i>C. mexicanus</i> (Coah)	3.8%	<i>S. lis</i> vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	3.8%
<i>S. lis</i> vs <i>S. spilosoma</i> (Coah)	0.004%	<i>S. lis</i> vs <i>S. spilosoma</i> (SLP)	0.0%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. spilosoma</i> (Coah)	3.4%	<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. spilosoma</i> (SLP)	3.8%
<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. spilosoma</i> (Coah)	3.4%	<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. spilosoma</i> (SLP)	3.8%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	0.0%	<i>S. spilosoma</i> (Coah) vs <i>S. spilosoma</i> (SLP)	0.004%

Las topologías obtenidas para la secuencia del gen citocromo b, a nivel de aminoácidos, con el análisis de Distancia (utilizando el modelo de dos Parámetros de Kimura), y con el análisis de Parsimonia, ambos por medio de una búsqueda exhaustiva, fueron similares, en donde se ubica a *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma* como dos grupos monofiléticos y a *Sciurus lis* como grupo externo (Fig. 27), sin embargo es importante señalar que *S. spilosoma* de Coahuila se ubica como grupo basal a *S. spilosoma* de SLP. En este caso, no se efectuó un análisis de Máxima Probabilidad debido a que para ello es preciso asignar el peso correspondiente a cada aminoácido de acuerdo a su posición en el codón.

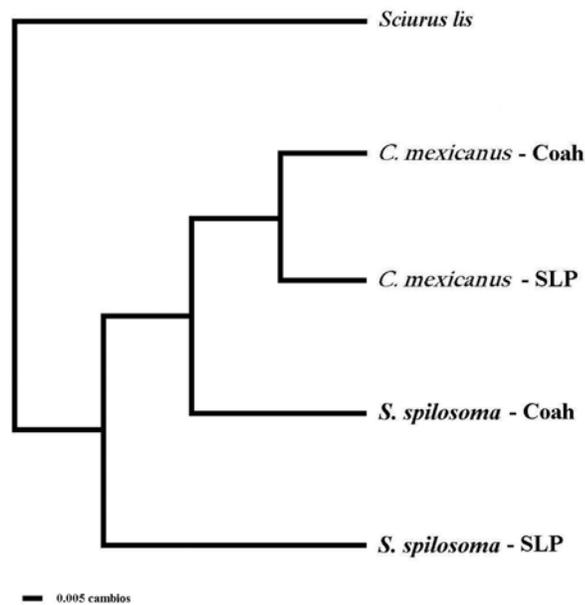


Figura 27. Topología basada en la secuencia del gen citocromo b (a nivel de aminoácidos) y generada con el método de Distancia y Parsimonia (L = 13, IC = 1.000, IH = 0.000, IR = 1.000), utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura.

11.4.2 Región control

Para observar las relaciones filogenéticas de nuestras especies de estudio a nivel de la región control, se analizaron dos bloques por separado, por un lado, el dominio central por ser la región más conservada de la región control, y por otro lado, el dominio ETAS por ser el bloque que presenta mayor variación de la región control.

10.6.2.1 Dominio Central

La longitud del dominio central fue de 318 caracteres, de los cuales 274 permanecieron constantes, 37 se comportaron como caracteres parsimoniosos no informativos, y 7 fueron caracteres parsimoniosos “informativos”.

El mayor porcentaje de divergencia en esta región se obtuvo entre *C. mexicanus*-*S. pilosoma* (2.2-2.6%); éste resultó menor entre éstas especies y *S. vulgaris* (0.73%); no obstante a nivel intra-específico fue bajo, 0% para *C. mexicanus* y 0.4% para *S. pilosoma* (Tabla 14).

Tabla 14. Divergencia nucleotídica en el dominio central entre las especies de estudio (*C. mexicanus* y *S. pilosoma*), así como del grupo externo (*Sciurus vulgaris*).

Relaciones	Divergencia Nucleotídica	Relaciones	Divergencia Nucleotídica
<i>S. vulgaris</i> vs <i>C. mexicanus</i> (Coah)	0.73%	<i>S. vulgaris</i> vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	0.73%
<i>S. vulgaris</i> vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	2.6%	<i>S. vulgaris</i> vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	2.2%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	2.2%	<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	2.6%
<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	2.6%	<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	2.6%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	0.0%	<i>S. pilosoma</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	0.4%

Los cladogramas obtenidos con el análisis de Distancia, Parsimonia y Máxima Probabilidad, resultaron similares (Fig. 28).

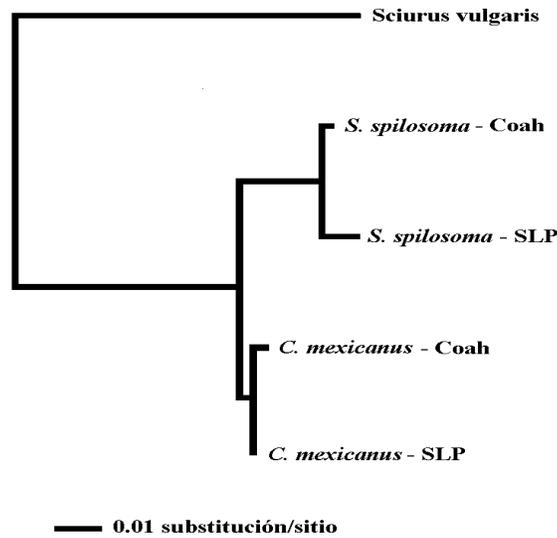


Figura 28. Cladograma consenso para los análisis de Distancia, Parsimonia (L = 49, IC = 0.9796, IH = 0.0204, IR = 0.8571) y Máxima Probabilidad del dominio central de la región control.

11.4.2.1 Dominio ETAS

Se analizaron 373 caracteres para el dominio ETAS, de los cuales 259 permanecieron constantes, 54 se comportaron como caracteres parsimoniosos no informativos, y 60 fueron caracteres parsimoniosos “informativos”.

Los porcentajes de divergencia nucleotídica de éste bloque de la región control se muestra en la Tabla 15. En este bloque se presentan porcentajes altos de divergencia entre los grupos de estudio. El porcentaje de divergencia nucleotídica resultó de 10.5% entre *Sciurus vulgaris*-*C. mexicanus* y de 9.1% entre *S. vulgaris*-*S. pilosoma*; por su parte, la divergencia entre *C. mexicanus* y *S. pilosoma* fue de 16.1%. Las únicas relaciones donde el porcentaje de divergencia resultó bajo fue a nivel intra-específico, nulo para *C. mexicanus* y 0.3% en *S. pilosoma*.

Tabla 15. Divergencia nucleotídica en el dominio ETAS entre las especies de estudio (*C. mexicanus* y *S. pilosoma*), así como del grupo externo (*Sciurus vulgaris*).

Relaciones	Divergencia Nucleotídica	Relaciones	Divergencia Nucleotídica
<i>S. vulgaris</i> vs <i>C. mexicanus</i> (Coah)	10.5%	<i>S. vulgaris</i> vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	10.5%
<i>S. vulgaris</i> vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	9.1%	<i>S. vulgaris</i> vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	9.1%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	16.1%	<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	16.1%
<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	16.1%	<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	16.1%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	0.0%	<i>S. pilosoma</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	0.3%

Los cladogramas para el dominio ETAS, obtenidos con el análisis de Distancia, Parsimonia y Máxima Probabilidad, resultaron semejantes a los obtenidos para el dominio central (Fig. 29).

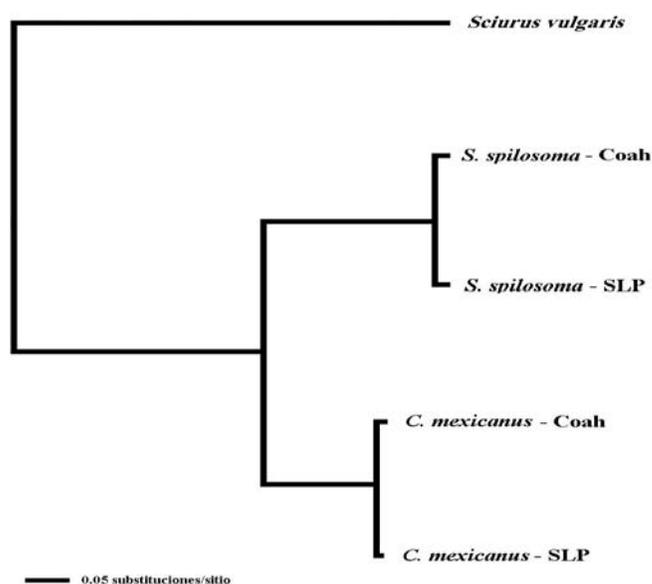


Figura 29. Cladograma consenso para los análisis de Distancia, Parsimonia (L = 128, IC = 1.0, IH = 0.0, IR = 1.0) y Máxima Probabilidad del Dominio ETAS de la región control.

11.4.3 Análisis Combinado: Región Control-Citocromo b

La serie de datos del análisis combinado consistió de 1729 caracteres para *C. mexicanus* y *S. pilosoma*, utilizando a *Sciurus vulgaris* como grupo externo. Del total, 1245 caracteres permanecieron constantes, 318 se comportaron como caracteres parsimoniosos no informativos, y 166 fueron caracteres informativos de parsimonia.

Dentro de este análisis resultaron evidentes las diferencias intra-específicas e inter-genéricas de los diferentes grupos analizados (Tabla 16). La divergencia intra-específica en *C. mexicanus* resultó nula y baja para *S. pilosoma* (0.3%). Contrario de esto, el porcentaje de divergencia inter-genérico (*C. mexicanus*-*S. pilosoma*) fue alto (9.4-9.6%); menor a éste porcentaje resultó la divergencia entre éstas dos últimas especies con respecto a *Sciurus vulgaris* (4.8-6.1%).

Tabla 16. Divergencia nucleotídica para análisis combinado de la región control y el gen citocromo b entre las especies de estudio (*C. mexicanus* y *S. pilosoma*), así como del grupo externo (*Sciurus vulgaris*).

Relaciones	Divergencia Nucleotídica	Relaciones	Divergencia Nucleotídica
<i>S. vulgaris</i> vs <i>C. mexicanus</i> (Coah)	6.1%	<i>S. vulgaris</i> vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	6.1%
<i>S. vulgaris</i> vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	5.9%	<i>S. vulgaris</i> vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	4.8%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	9.4%	<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	9.6%
<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (Coah)	9.4%	<i>C. mexicanus</i> (SLP) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	9.6%
<i>C. mexicanus</i> (Coah) vs <i>C. mexicanus</i> (SLP)	0.0%	<i>S. pilosoma</i> (Coah) vs <i>S. pilosoma</i> (SLP)	0.3%

Las topologías resultantes presentaron un esquema consistente para los tres análisis empleados, análisis de Distancia (utilizando el modelo de dos Parámetros de Kimura), análisis de Parsimonia, ambos por medio de una búsqueda exhaustiva, y el análisis de Máxima Probabilidad (Fig. 30).

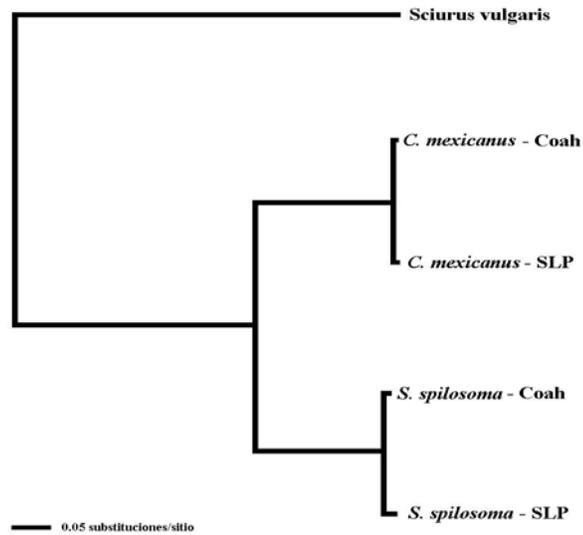


Figura 30. Topología consenso para los análisis de Distancia, Parsimonia (L = 531, IC = 0.9944, IH = 0.0056, IR = 0.9819) y Máxima Probabilidad para el análisis combinado de la región control y citocromo b.

11.5 Restricción Enzimática

En la Figura 31 se presentan los patrones de restricción generados con la enzima Rsa I, para cada uno de los fragmentos mitocondriales (región control, citocromo b y 16S); la λ ladder utilizada fue de Biorad 170-8201 20 pb.



Figura 31. Restricción Enzimática utilizando la Endonucleasa Rsa I.

C. mexicanus A-B (D-Loop), C-D (cit b), E-F (16S).

S. pilosoma G-I (D-Loop), J-L (cit b), M-O (16S).

I) Patrón de corte de 90 pb; II) Productos no digeridos.

En la Tabla 17 se observan los productos de los fragmentos amplificados que resultaron en la generación de 2 patrones genéricos (haplotipos A y B), con excepción de la región control que resultó no informativa para detectar polimorfismo a nivel intra-específico e inter-genérico.

Tabla 17. Patrones de restricción (haplotipos) generados para la enzima Rsa I con los marcadores moleculares región control, gen citocromo b y gen 16S (nt). 1. San Juan del Retito (Coah). 2. El Manantial (SLP). 3. El Gallo (SLP).

Especie/Población	Marcador Molecular/Enzima			Haplotipo
	D-Loop/Rsa I	Cit b/Rsa I	16S/Rsa I	
<i>C. mexicanus</i> /Coah ¹	800/250/90	680/480	600	A
<i>C. mexicanus</i> /SLP ²	800/250/90	680/480	600	A
<i>S. pilosoma</i> /Coah ¹	800/250/90	520/360	340/250	B
<i>S. pilosoma</i> /SLP ²	800/250/90	520/360	340/250	B
<i>S. pilosoma</i> /SLP ³	800/250/90	520/360	340/250	B

12. DISCUSIÓN

12.1 Variación y divergencia genética

La variación de las secuencias en el gen citocromo b entre *C. mexicanus* y *S. pilosoma* resultó en el intervalo de 8.4-8.6%, en donde la mayor parte del cambio estuvo reflejado en transiciones (Tabla 8), como se ha presentado con otros roedores (Smith y Patton, 1991; Prager *et al.*, 1993; Spotorno *et al.*, 2001). Asimismo, la tasa transición/transversión (TS/TV) de *C. mexicanus* contra *S. pilosoma* resultó de 9.0-9.2% (Tabla 8), semejantes a los datos obtenidos por Smith y Patton (1991) en roedores del género *Akodon*.

Por su parte, las secuencias de la región control de las especies de estudio presentaron un intervalo de variación de 11.6-11.7%. Similar a los resultados reportados para la región control de ADNmt en diversas especies de animales (el pez arcoiris [Zhu *et al.*, 1994], *Drosophila sp.* [Desalle *et al.*, 1987] y primates [Tagliaro *et al.*, 1997]), para *C. mexicanus* y *S. pilosoma* las transiciones fueron más frecuentes que las transversiones acumuladas (Tabla 10).

Tanto para el gen citocromo b como para la región control, podemos observar que las inserciones y/o deleciones fueron raramente observadas y la mayor parte de la variación intra-específica e inter-genérica se debió a sustituciones. Para el gen citocromo b la mayoría de éstas se vieron reflejadas en sitios silenciosos, sin embargo algunos cambios se han visto reflejados a nivel de aminoácidos como lo demuestra el multialineamiento de aminoácidos (Anexo IV) en donde observamos que las sustituciones nucleotídicas causaron 8 cambios entre *C. mexicanus* y *S. pilosoma*: 5 de valina a isoleucina y 1 de isoleucina a valina (dos aminoácidos alifáticos encargados de formar músculo), 1 de valina a alanina (dos aminoácidos alifáticos) y 1 de isoleucina a treonina (cambio importante por pasar de un aminoácido encargado de formar músculo-alifático- a uno que interviene en labores de desintoxicación del

hígado-hidrofóbico) (Lenhinger, 1985). En este sentido 7 cambios a nivel de aminoácidos se presentaron en la zona transmembranal y 1 en la zona extramembranal del gen citocromo b (Anexo III) tomando como base para ello el “modelo de ocho dominios” propuesto por Howell y Gilbert (1988). De acuerdo a Irwin *et al.*, (1991) la zona transmembranal es la región más variable del gen citocromo b en mamíferos, lo mismo sucede con otros grupos de vertebrados como los peces (Whitmore *et al.*, 1994), y de acuerdo a éste último autor es en esta zona donde ocurre el 90% de las sustituciones de aminoácidos.

En el caso de la región no codificante de proteínas (región control), la mayor parte de los cambios a nivel inter-genérico (*C. mexicanus*-*S. spilosoma*) se presentaron en los dominios ETAS y CSB (Fig. 18 y 20), los cuales están considerados como los dominios más variables de la región control en roedores (Larizza *et al.*, 2002). De las 117 sustituciones que se presentaron a nivel inter-genérico el 47.9% fueron en el dominio ETAS y el 44.4% en el dominio CSB, el 7.7% se presentaron en el dominio central. A nivel intra-específico, por la baja cantidad de sustituciones, no fue posible observar esta relación.

De manera general, los resultados de los análisis de inferencia filogenética indican que la divergencia nucleotídica intra-específica resultó nula para *C. mexicanus* con excepción de los análisis del gen citocromo b presentados en la Tabla 12 donde existió una divergencia de 0.14%. Estos datos concuerdan con la baja variabilidad genética intra-específica obtenida por McCullough y Chesser (1987) quienes reportaron distancias genéticas de Rogers entre 0.033-0.045 para *C. mexicanus* en Nuevo León y Coahuila en base a la variación electroforética de 45 loci (isozimas).

A pesar de que en todos los análisis los porcentajes de divergencia intra-específica en *S. spilosoma* fueron mayores con respecto a *C. mexicanus*, éstos resultaron bajos: 0.3-0.98% en el gen citocromo b (Tablas 11, 12), 0.004% a nivel de aminoácidos (Tabla 13), 0.4% en el dominio central (Tabla 14) y 0.3% en el dominio ETAS (Tabla 15) de la región control; y 0.3% en el análisis combinado región control-citocromo b (Tabla 16).

Los porcentajes de divergencia nucleotídica a nivel inter-genérico (*C. mexicanus*-*S. pilosoma*) para el gen citocromo b fueron de 8.2-8.5% (Tabla 11), 8.0-9.3% (Tabla 12) y 3.4-3.8% a nivel de aminoácidos (Tabla 13), mientras que para la región control fueron de 2.2-2.6% en el dominio central (Tabla 14) y 16.1% en el dominio ETAS (Tabla 15). Esto apoya la separación taxonómica que existe entre dichos géneros (Hollister, 1916; Hall, 1981).

Un aspecto interesante es el hecho de haber observado, en varios de los análisis, mayores divergencias entre *C. mexicanus*-*S. pilosoma*, que entre éstas y el grupo externo – *Sciurus lis* para citocromo b y *S. vulgaris* para región control– (Tablas 11, 14, 15, 16). Tomando en consideración éstos datos y los resultados obtenidos por Herron *et al.* (en prensa), quien encontró conflictos entre las relaciones filogenéticas y la taxonomía actual, a todos los niveles de la familia Sciuridae, cabe la posibilidad de que el género *Sciurus* no haya sido el grupo externo más adecuado para la elaboración de estos análisis.

Un punto que resulta necesario resaltar dentro del análisis del gen citocromo b con secuencias adicionales del género *Cynomys* y *Spermophilus* (Tabla 12), es el hecho de que algunos porcentajes de divergencia nucleotídica inter-específica del género *Spermophilus*, como en el caso de *S. pilosoma*-*S. washingtoni* (11.6%) y *S. pilosoma*-*S. madrensis* (15.0%), resultaron mayores a las comparaciones de *S. washingtoni* y *S. madrensis* con respecto a *Cynomys mexicanus* (10.9% y 14.4%, respectivamente). Esto indica una mayor divergencia nucleotídica entre especies del mismo género que entre especies de género distinto lo cual demuestra que en algunas especies del género *Spermophilus* existen conflictos entre las relaciones filogenéticas de este estudio y la taxonomía de Hall (1981) y Nadler *et al.* (1982).

Al analizar el dominio central y el dominio ETAS de la región control, los datos apoyan los resultados obtenidos por autores como Gremmell *et al.* (1996) y Sbisà *et al.* (1997) quienes afirman que para mamíferos el dominio central es el bloque más conservado de la región control, mientras que se confirma que el dominio ETAS es el más variable de la misma. De los 318 caracteres analizados del dominio central, más del 85% fueron caracteres constantes (274) y solamente 7 (2.2%) fueron caracteres parsimoniosos informativos, mientras

que para el dominio ETAS se analizaron 373 caracteres de los cuales 259 (69.4%) fueron constantes y 60 (16.0%) fueron caracteres parsimoniosos informativos. Estas diferencias en la cantidad de caracteres parsimoniosos informativos se vieron reflejadas en la divergencia nucleotídica de ambos dominios. Las diferencias más notables se presentaron en las relaciones inter-genéricas (*C. mexicanus*-*S. pilosoma*), ya que para el dominio central estuvieron en el intervalo de 2.2-2.6%, mientras que para el dominio ETAS resultaron de 16.1% (Tablas 14 y 15).

En cuanto a la restricción enzimática, para los tres fragmentos mitocondriales utilizados, los haplotipos generados por la endonucleasa Rsa I indicaron que sus sitios de restricción son altamente conservados, lo que reveló nula variabilidad genética intra-específica tanto para *Cynomys mexicanus* como para *Spermophilus pilosoma* (Tabla 17). Existen estudios donde la enzima Rsa I sí ha revelado variabilidad a nivel intra-específico, como es el caso del trabajo de Ittig y Gardenal (2002) en donde la enzima Rsa I presentó cuatro patrones de restricción (haplotipos) para la región control (D-Loop) en *Calomys musculus* (Rodentia: Muridae).

Alternativamente, observamos que dicha enzima resultó informativa a nivel inter-genérico (*C. mexicanus*-*S. pilosoma*), para los marcadores citocromo b y 16S, en donde se observan distintos patrones de corte; para la región control los patrones de corte están conservados a nivel intra-específico e inter-genérico (Fig. 31; Tabla 17).

El uso de las secuencias de *C. mexicanus* y *S. pilosoma* generadas en este trabajo proporcionó una variedad de enzimas informativas (Anexo I) a mencionar: para la región control, FatI y NlaIII en *C. mexicanus* y, BfuCI, DpnI, MboI, Sau3AI y TaqI en *S. pilosoma*, mientras que para el gen citocromo b, AluI y HpyCH4V en *C. mexicanus* y AluI, BfaI, BfuCI, DpnI y Sau3AI en *S. pilosoma*. Resulta necesario llevar a cabo la digestión de éstas enzimas de restricción informativas que permitiría comparar los resultados obtenidos en este estudio.

12.2 Relaciones filogenéticas entre *Spermophilus* y *Cynomys*

De forma general, los cladogramas generados (utilizando únicamente las especies objeto de estudio) con los análisis de distancia, parsimonia y máxima probabilidad para la secuencia del gen citocromo b (secuencias nucleotídicas y aminoácidos), para la región control (dominio central y ETAS) y en el análisis combinado (región control-citocromo b), indican que *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma* se ubican como dos grupos monofiléticos lo cual apoya la separación taxonómica que existe entre dichos géneros (Hollister, 1916; Hall, 1981). En este punto cabe resaltar que los perritos de las praderas (*Cynomys*) difieren anatómicamente de sus parientes cercanos, las ardillas de tierra (*Spermophilus*) por tener un cuerpo de mayor tamaño, dientes más grandes con coronas más altas y cráneos más anchos (Hollister, 1916; Hall, 1981). Asimismo, se tienen datos inmunológicos que respaldan la separación de éstos dos géneros (Hight *et al.*, 1974) y de acuerdo a registros paleontológicos los perritos de las praderas divergieron de las ardillas de tierra hace aproximadamente 2 ó 3 millones de años (Hibbard, 1942; Bryant, 1945; Green, 1960; Black, 1963; Pizzimenti, 1975).

Sin embargo, las topologías para los análisis del gen citocromo b utilizando secuencias adicionales del GenBank nos indican aspectos sobresalientes en las relaciones filogenéticas de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus*.

En primer lugar, dentro del análisis con el uso de secuencias adicionales de otras especies pertenecientes al género *Cynomys* (*C. ludovicianus*, *C. gunnisoni*, *C. parvidens* y *C. leucurus*), particularmente al aplicar los análisis de Máxima Probabilidad (Fig. 23), las topologías indican que *C. mexicanus* y *C. ludovicianus* se comportan como un grupo parafilético con respecto a *C. gunnisoni*, *C. parvidens* y *C. leucurus*, las cuales a su vez se ubican topológicamente como un grupo estrechamente relacionado a *Spermophilus spilosoma*. Se han encontrado datos inmunológicos (Hight *et al.*, 1974), morfológicos (Bryan, 1945; Black, 1963) y de comportamiento (Fitzgerald y Lechleitner, 1974; Waring, 1970), que

indican que especies como *C. gunnisoni*, *C. parvidens* y *C. leucurus* son más parecidas a las ardillas de tierra (*Spermophilus*) que a otras especies de *Cynomys*.

En este sentido, Hollister (1916) y Pizzimenti (1975) subdividieron el género *Cynomys* en dos subgéneros basándose en datos cromosómicos y bioquímicos: *Leucocrossuromys*, que comprende las especies *C. gunnisoni*, *C. parvidens* y *C. leucurus*, y el subgénero *Cynomys*, que incluye a *C. mexicanus* y *C. ludovicianus*. Para los miembros de éste último subgénero se tiene la idea de que *C. mexicanus* probablemente se originó como una población relicto de *C. ludovicianus*, que quedó aislada durante las glaciaciones del Pleistoceno, debido a la expansión y contracción de los intervalos geográficos de ésta especie (Pizzimenti, 1975). Los resultados obtenidos (Figs. 22-23) apoyan esta separación.

En segundo lugar, dentro del análisis con el uso de secuencias adicionales de otras especies de los géneros *Cynomys* (*C. ludovicianus*, *C. gunnisoni*, *C. parvidens* y *C. leucurus*) y *Spermophilus* (*S. brunneus*, *S. beldingi*, *S. columbianus*, *S. lateralis*, *S. madrensis*, *S. mexicanus mexicanus*, *S. mexicanus parvidens*, *S. tereticaudus*, *S. townsendii* y *S. washingtoni*), las topologías de Distancia, Parsimonia y Máxima Probabilidad (Figs. 24-26) resultaron similares y los resultados de estos análisis apoyan la presencia de una parafilia en las especies del género *Spermophilus* (*S. mexicanus*, *S. tereticaudus* y *S. spilosoma*) y las especies del género *Cynomys* (Figs. 24-26), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Herron *et al.* (en prensa) quien menciona que las ardillas terrestres holárticas (*Spermophilus*) son parafiléticas con respecto a los perritos de las praderas (*Cynomys*). Sin embargo, si se toma en cuenta la ubicación de todas las especies de *Spermophilus* (Figs. 24-26) se observa que cada uno de los clados proviene de un ancestro independiente, lo cual concuerda con la definición de un grupo polifilético el cual es agrupamiento de caracteres convergentes, es decir la evolución independiente del mismo carácter con diferente ancestro (Page y Holmes, 1998).

Dentro de este último análisis se encontraron otros aspectos importantes. En todos los análisis (Figs. 24-26) las topologías indican que *S. mexicanus* y *S. spilosoma* se colocan en distintos clados, no obstante ambas especies taxónomicamente están incluidas en el subgénero

Ictidomys (Hall, 1981); por otro lado los cladogramas muestran que *S. pilosoma* se encuentra estrechamente relacionada a *S. tereticaudus*, la cual es una especie que taxonómicamente forma parte de otro subgénero distinto (*Xerospermophilus*) (Tabla 3) (Corbet, 1978; Hall, 1981). Esto indica una falta de correspondencia entre la taxonomía actual y las relaciones filogenéticas de varias especies del género *Spermophilus* lo cual establece la necesidad de una revisión taxonómica de este género.

Por otro lado, resulta importante mencionar que el uso de diferentes métodos (Distancia, Parsimonia y Máxima Probabilidad) ha sido ventajoso, debido a que la presencia de politomías ha sido resuelta con uno u otro método. Particularmente en las topologías con el uso de secuencias complementarias de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* se presenta una politomía con los géneros *S. beldingi* y *S. columbianus* dentro del análisis de distancia (Fig. 24), sin embargo esta se resuelve con el análisis de Máxima Probabilidad (Fig. 26). Los métodos de distancia se basan en la distancia evolutiva (cambios nucleotídicos) de la serie de secuencias, mientras que los métodos discretos (Parsimonia y Máxima Probabilidad) operan directamente sobre las secuencias o sobre funciones derivadas de ellas, evitando la pérdida de información que ocurre cuando las secuencias son convertidas en distancias. En este sentido, el método de Máxima Probabilidad nos reveló las politomías debido a que al valerse de modelos explícitos de evolución secuencial localizó los cambios nucleotídicos que el método de distancia no logró reconocer (Page y Holmes, 1998).

12.3 Algunos aspectos Biogeográficos

En este apartado se realizó un análisis solamente de los cladogramas del gen citocromo b donde se incluyen a las secuencias adicionales del GenBank de otras especies de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus*, principalmente las topologías de Distancia y Máxima Probabilidad (Figs. 24 y 26) las cuales indican que existen ciertos patrones en las relaciones filogenéticas y su distribución geográfica y taxonomía.

Dentro de éstos cladogramas se distinguen 4 clados principales (Figs. 24 y 26). Un primer clado lo conforman *S. madrensis* y *S. lateralis*. Ambas especies no se encuentran alejadas geográficamente, reconociendo sus actuales intervalos de distribución, *S. madrensis* al suroeste de Chihuahua y Durango, y *S. lateralis* ubicado geográficamente de la Columbia Británica al sur de Nuevo México, y del sur del río Columbia al sur de California y Nevada; taxonómicamente están conformadas, junto con *S. saturatus* (no incluida en este trabajo), en el subgénero *Callospermophilus* (Hall, 1981; Best y Thomas, 1991; Rickart y Yensen, 1991).

Dentro del segundo clado, encontramos a *S. brunneus*, *S. townsendii*, *S. beldingi*, *S. columbianus* y *S. washingtoni*, que taxonómicamente forman parte del subgénero *Spermophilus* (Hall, 1981). Todas las especies de este clado presentan una cercanía geográfica: todas se localizan en la parte noroeste de los Estados Unidos de Norteamérica (*S. brunneus* en el oeste de Idaho; *S. townsendii* en Nevada, O de Utah, E de California, SE de Idaho, E de Oregón y Centro-Sur de Washington; *S. beldingi* al E Oregon, SO Idaho, NE de California, N de Nevada y NO de Utah; *S. columbianus* en el SE de la Columbia Británica y O de Alberta (Canada), al NE de Oregón, C de Idaho y C de Montana; *S. washingtoni* al E del río Columbia en Washington y al NE de Oregón) (Hall, 1981; Jenkins y Eshelman, 1984; Rickart, 1987; Elliott y Flinders, 1991; Rickart y Yensen, 1991; Yensen y Sherman, 1997).

Un tercer clado está formado por las subespecies *S. mexicanus mexicanus* y *S. mexicanus parvidens*, ambas localizadas geográficamente en México. La primera se distribuye en Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Puebla y Tlaxcala, y la segunda se extiende desde los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Zacatecas hasta el norte de Nuevo México y el oeste-centro de Texas (Baker *et al.*, 1981).

Asimismo, los resultados indican que *S. mexicanus* se coloca filogenéticamente como un grupo basal de todas las especies del cuarto y último clado, con las cuales comparten algunas zonas de su intervalo geográfico (en los estado del norte de México), específicamente *S. mexicanus parvidens*. En este el último clado se encuentran *S. pilosoma*, *S. tereticaudus* y el conjunto de las especies del género *Cynomys*. El intervalo geográfico de éstas dos especies

del género *Spermophilus* abarca parte del norte de México y sur de los Estados Unidos de Norteamérica (Hall, 1981), por lo que geográficamente se encuentran relacionadas entre ellas y con las especies del género *Cynomys*.

Las especies del género *Cynomys* también presentan algunos patrones en las relaciones filogenéticas y distribución geográfica. Los resultados de los cladogramas muestran a las especies del subgénero *Leucocrossuromys* apartados del subgénero *Cynomys*; de igual manera, geográficamente existe un patrón de separación similar, los miembros del subgénero *Leucocrossuromys* se distribuyen exclusivamente en los Estados Unidos de Norteamérica: *C. gunnisoni* en algunas zonas de Utah, Colorado, Nuevo México y Arizona; *C. leucurus* en parte de Utah, Colorado, Wyoming y Montana; y, *C. parvidens* en el sureste medio de Utah. Mientras tanto las especies del subgénero *Cynomys* presentan una distribución completamente diferente: *C. ludovicianus* se localiza geográficamente desde Canadá hasta el Norte de México, mientras que *C. mexicanus* sólo se localiza en ciertas regiones de San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León (México) (Hall, 1981).

Estos patrones observados indican una congruencia en las relaciones filogenéticas y distribución geográfica de especies de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus*, lo cual sugiere que las especies que conforman cada uno de los clados tienen una asociación geográfica entre sí, probablemente lograda como resultado de estar sujetos a la misma historia medioambiental, tal como ha sucedido con vertebrados de Australia (Schneider *et al.*, 1998), tortugas de agua dulce y terrestres (Walker y Avise, 1998), en ardillas voladoras (Arbogast, 1999) y roedores mesoamericanos (Sullivan *et al.*, 2000).

12.4 Características de la región control

El multialineamiento efectuado entre las secuencias nucleotídicas de la región control de las especies de estudio y de *Sciurus vulgaris* permitió detectar favorablemente las características que a continuación se presenta.

12.4.1 Longitud de la región control. Al parecer mientras más cercanas evolutivamente sean las especies éstas presentan una mayor similitud en la longitud de la región control (Tabla 9). La longitud obtenida para *C. mexicanus* y *S. pilosoma* fue similar, 1062 y 1063-4 nucleótidos (nt), respectivamente; en este trabajo se secuenció el 90% de la región control (Fig. 16). En este caso, posiblemente por tratarse de especies cercanas evolutivamente la longitud de dicha región fue semejante, sin embargo ésta suele ser variable entre géneros de roedores de diferente familia, por ejemplo para Muridae tenemos a *Mus musculus domesticus* (ratón doméstico) con 878 nt y *Rattus rattus* (rata común) con 920 nt; para Sciuridae, *Sciurus vulgaris* con 1059; para Gliridae tenemos a *Glis glis* (glis) con 1157 nt; y para Bathyergidae, *Heliophobius argenteocinereus* (helio) con 1395 nt y *Cryptomys damarensis* (crypto) con 1383 nt (Larizza *et al.*, 2002). Rand (1993) discute que las diferencias en longitud son causadas por la variación en el número de copias de secuencias repetidas al azar presentes en los dominios periféricos ETAS y CSB, lo cual es común en algunas especies de roedores (*Cavia porcellus*, *Mus musculus*, entre otros) (Fig. 17).

12.4.2 Dominios de la región control. Sbisà *et al.* (1997) analizaron 27 secuencias de la región control en 10 órdenes de mamíferos y reportaron la presencia de tres dominios característicos: el dominio ETAS, el dominio central y el dominio CSB; la presencia de éstos dominios en *C. mexicanus* y *S. pilosoma* es fuertemente apoyada por la presencia de bloques conservados específicamente el bloque ETAS1 (ubicado entre posiciones 115-185) (Fig. 18), el dominio central (Fig. 19) y el bloque CSB1 (entre posiciones 50-73) (Fig. 20) y la presencia de sitios altamente variables encontrados en el dominio ETAS (entre las posiciones 1-114 y 186-373) (Figs. 18) y en el dominio CSB (entre las posiciones 1-49 y 74-391) (Fig. 20).

Existen otros trabajos donde diversas especies de roedores siguen esta estructura general de la región control (Brown *et al.*, 1986; Saccone *et al.*, 1987; Matson y Baker, 2001; Larizza *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2003).

El esquema general de la región control de *Sciurus vulgaris* es el más semejante al de nuestras especies de estudio (Fig. 17). Otras especies, como es el caso de *Rattus rattus* y *Cavia porcellus* tienen la característica de presentar tres bloques conservados en el dominio CSB (CSB1, CSB2 y CSB3); asimismo, ésta última especie se caracteriza por presentar, dentro del mismo bloque, repeticiones de secuencias cortas. Finalmente, *Mus musculus* además de presentar tres bloques conservados en el dominio CSB y repeticiones de secuencias cortas dentro del mismo, ostenta la característica de contar con repeticiones de secuencias largas en el dominio ETAS.

12.4.2.1 Dominio ETAS. Es el dominio más variable de la región control (Sbisà *et al.*, 1997). La longitud del dominio ETAS resultó equivalente a nivel intra-específico y similar entre las especies de estudio, 366nt para *C. mexicanus* y 367nt para *S. spilosoma*; esto lo atribuimos, por un lado, a que ninguna de las dos especies presenta repeticiones de secuencias cortas ó largas y, por otro al hecho de que en ambas especies el dominio ETAS consta de tres bloques: el bloque conservado ETAS1 (cuya longitud para ambas especies es de 71 nucleótidos), una región que es variable entre especies, localizada entre el ARNt^{pro} y el bloque ETAS1, y otra región variable situada entre el bloque ETAS1 y el Dominio Central. No obstante, se tiene registrado que la longitud de este dominio puede variar ampliamente de especie a especie, por ejemplo en *Rattus norvegicus* es de 253 nucleótidos, mientras que para *Heliophobius argenteocinereus* es de 723 nucleótidos (Larizza *et al.*, 2002). En nuestras especies de estudio, la longitud del dominio ETAS es similar, 366nt para *C. mexicanus* y 367nt para *S. spilosoma*.

El porcentaje de similitud nucleotídico intra-específico e inter-genérico resultó variable. A pesar de que el dominio ETAS es el más variable de la región control, a nivel intra-específico el porcentaje fue alto, entre los individuos de *C. mexicanus* de San Luis Potosí y Coahuila (100%) y, entre los individuos de *S. spilosoma* de San Luis Potosí y Coahuila

(99.2%). A nivel inter-genérico los porcentajes de no fueron tan altos; entre *S. vulgaris* y los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* el porcentaje resultó de 65.9% y 63.5%, respectivamente, por su parte, entre los dos géneros de estudio (*Cynomys-Spermophilus*), el porcentaje resultó un poco mayor (82.8%). Esto probablemente se deba a que entre estos géneros sí se presenta alta variación en los dos bloques variables encontrados en el Dominio ETAS.

Sbisà *et al.* (1997) documentaron que en otras especies de mamíferos como *Hylobates lar* (gibón), *Pan troglodytes* (chimpancé) ó *Glis glis* (roedor) se presentan los bloques ETAS1 y ETAS2. Sin embargo Larizza *et al.* (2002) considera que el bloque ETAS2 no puede ser considerado como un bloque conservado en las especies del orden Rodentia, a diferencia del bloque ETAS1 que siempre está presente en él.

Se afirma que el elemento ETAS1 puede contener la señal de reconocimiento para la terminación de la cadena nascente del ADN; ETAS2 puede contener sitios de unión para los factores de terminación (Sbisà *et al.*, 1997). El alto nivel de conservación encontrado dentro del elemento ETAS1 apoya la hipótesis de que este bloque sí puede tener una función estable en la replicación del ADNmt en este orden (Matson y Baker, 2001).

12.4.2.2 Dominio Central. A diferencia de los dominios periféricos (ETAS y CSB), el dominio central es altamente conservado (Sbisà *et al.*, 1997). Esto se corrobora con los datos, del multialineamiento del dominio central de *C. mexicanus*, *S. spilosoma* y *Sciurus vulgaris* (Fig. 19) que muestra que *C. mexicanus* de San Luis Potosí y Coahuila presentan una longitud de 315 nt, mientras que *S. spilosoma* tiene 316nt para San Luis Potosí y 317 para Coahuila; *Sciurus vulgaris* presenta una longitud de 317 nt.

Asimismo, el porcentaje de similitud entre los dos géneros de estudio es alto (>98%), lo mismo a nivel intra-específico (99.69% para *C. mexicanus* y 98.74% para *S. spilosoma*) y entre *S. vulgaris* y los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* (>87%). Pesole *et al.* (1999)

mencionaron que los bajos niveles de variación inter-específica del dominio central son similares al de los genes ARNt y ARNr en varios grupos de mamíferos.

No obstante, debido a su alto grado de conservación, lo cual se extiende a todos los vertebrados, la función de este dominio es incierta (Sbisà *et al.*, 1997). Sin embargo, Reyes *et al.* (2003) y Jackson *et al.* (1996), afirmaron que la posible participación de este dominio en la interacción con elementos del citoesqueleto puede explicar parcialmente su conservación.

12.4.2.3 Dominio CSB. Para mamíferos, el dominio CSB es menos variable en longitud que el dominio ETAS (Sbisà *et al.*, 1997). Larizza *et al.* (2002) reportaron que la longitud de este dominio para el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) es de 263 nt y para el roedor *Cryptomys damarensis* de 468 nt. En el presente estudio *C. mexicanus* presentó una longitud de 381 nt, mientras que *S. pilosoma* 376 nt para SLP y 378 nt para Coahuila (Tabla 9).

En mamíferos, este dominio puede presentar bloques de cortas secuencias conservadas llamadas CSB's (CSB1, CSB2 y CSB3) y propuestos como señales regulatorias para el procesamiento de los cebadores de ARN para la replicación de la cadena pesada (Sbisà *et al.*, 1997). En el presente estudio *C. mexicanus* y *S. pilosoma* solamente presentaron el bloque CSB1, el cual resultó ser un bloque totalmente conservado para ambas especies con 100% de similitud en la longitud (25 nt) y en la composición de bases (Fig. 20). En este sentido, Sbisà *et al.* (1997) documentó que el bloque CSB1 fue el más conservado para diversas especies de mamíferos y por lo tanto lo consideraron como el elemento más importante funcionalmente de este dominio ya que contiene los sitios de transición del ARN/ADN y los sitios de división del complejo ribonucleoproteínico durante la transcripción.

No obstante, dentro del orden de los roedores encontramos especies que presentan los tres bloques, así tenemos los casos de *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Cavia porcellus*, entre otros (Larizza *et al.*, 2002), (Fig. 17), sin embargo la función de los bloques CSB2 y CSB3 aún no ha sido averiguada (Sbisà *et al.*, 1997). El grado de conservación de éstos

bloques puede ser variable entre especies. Matson y Baker (2001) encontraron que varias especies del roedor del género *Clethrionomys* presentaron el bloque CSB3 como el más conservado, seguido por el CSB1 y finalmente el CSB2.

13. CONCLUSIONES

La variación de las secuencias en el gen citocromo b entre *C. mexicanus* y *S. pilosoma* resultaron menores (8.4-8.6%) que la variación en las secuencias de la región control (11.6-11.7%) en donde las transiciones fueron más frecuentes que las transversiones acumuladas y las inserciones y/o deleciones fueron raras.

En todos los análisis los porcentajes de divergencia nucleotídica intra-específica con el gen citocromo b y la región control fueron bajos en *C. mexicanus* y *S. pilosoma*; los porcentajes de divergencia inter-genérica resultaron más altos. Sin embargo, los análisis filogenéticos con el gen citocromo b utilizando secuencias adicionales del GenBank de especies de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* indicaron que algunas relaciones entre especies del género *Spermophilus* (*S. pilosoma*-*S. washingtoni*) presentan porcentajes de divergencia nucleotídica mayores a las comparaciones entre especies de géneros diferentes (*Cynomys mexicanus*- *S. washingtoni*).

Los cladogramas generados exclusivamente con las especies de estudio indican que *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus pilosoma* se ubican como dos grupos monofiléticos. Sin embargo, las topologías obtenidas en el análisis del gen citocromo b utilizando secuencias adicionales del GenBank de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* indican la presencia de una parafilía en algunas especies del género *Spermophilus* (*S. mexicanus*, *S. tereticaudus* y *S. pilosoma*) y las especies del género *Cynomys*; sin embargo, esta afirmación podría considerarse una polifilia en el género *Spermophilus*. También se encontraron conflictos entre las relaciones filogenéticas de éstas especies del género *Spermophilus* y la taxonomía actual, resultados que sugieren efectuar una revisión taxonómica de este género.

Los análisis filogenéticos con secuencias adicionales de los géneros *Cynomys* y *Spermophilus* a nivel del gen citocromo b también permitieron observar patrones entre la ubicación de las especies en los cladogramas y su distribución geográfica actual.

Referente a la descripción de la región control, para *C. mexicanus* y *S. pilosoma* existió la presencia de tres dominios característicos en mamíferos: el dominio ETAS, el Dominio Central y el dominio CSB. Para ambas especies se presentaron dos bloques conservados, el ETAS1 y el CSB1, y en ninguno de los taxa se registraron repeticiones de secuencias cortas o largas.

Por su parte, la endonucleasa Rsa I no fue informativa en ninguno de los fragmentos mitocondriales a nivel intra-específico, no obstante sí resultó informativa para los genes citocromo b y 16S a nivel inter-genérico (*C. mexicanus*-*S. pilosoma*). Para la región control esta enzima no fue informativa a nivel intra-específico e inter-genérico.

Finalmente, como puntos alternativos se proponen las siguientes sugerencias y recomendaciones. El empleo de cebadores no-específicos durante la reacción en cadena de la polimerasa permitió cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, sin embargo ante la falta de información sobre cebadores específicos de las especies de estudio resulta recomendable efectuar el diseño de éstos que permitiría, por un lado, verificar los resultados obtenidos en el presente estudio y, por otro, disponer de elementos metodológicos más firmes para el desarrollo de futuros estudios moleculares sobre *C. mexicanus* y/o *S. pilosoma*.

Se sugiere que se realicen análisis de PCR-RFLP's con las enzimas de restricción informativas obtenidas a partir de las secuencias producidas en este trabajo. Para la región control, FatI y NlaIII en *C. mexicanus* y, BfuCI, DpnI, MboI, Sau3AI y TaqI en *S. pilosoma*, mientras que para el gen citocromo b, AluI y HpyCH4V en *C. mexicanus* y AluI, BfaI, BfuCI, DpnI y Sau3AI en *S. pilosoma*. Dicha información permitiría esclarecer interrogantes sobre genética de poblaciones que podrían ser de utilidad para sugerir estrategias de manejo.

Por último resultaría adecuado elaborar un análisis similar al elaborado en este trabajo que involucrara un tamaño de muestra mayor con individuos de las localidades aquí tratadas y, en la medida de lo posible, de otras zonas no emprendidas; asimismo, resulta indispensable el

empleo de distintos genes mitocondriales (*e.g.*, 12S) así como de genes de la molécula del ADN nuclear que permitan contar con bases más fuertes para apoyar o refutar los resultados obtenidos. Esto permitirá tener un conocimiento más amplio y sólido sobre la variabilidad genética y las relaciones filogenéticas del perrito mexicano de las praderas y de la ardilla de tierra manchada.

14. LITERATURA CITADA

- Alarcón, M. V. 2003. Las ardillas de México. *Biodiversitas*, 51. 1-7 p.
- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson. 1994. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. XLIII. New York, 1294 p.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Aragón, P. E. y C. Baudoin. 1989. Algunos aspectos reproductivos de dos especies de ardillas del género *Spermophilus* (Rodentia: Sciuridae) en una zona de simpatria del desierto chihuahuense. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 36: 1-25.
- Arbogast, B. S. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography of the New World flying squirrel (*Glaucomys*): Implications for Pleistocene biogeography. *Journal of Mammalogy*, 80(1): 142-155.
- Arita, T. A. y G. Ceballos. 1997. Los mamíferos de México: distribución y estado de conservación. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 2:33-71.
- Ashley, M. V. 1999. Molecular conservation genetics. *American Scientist*, 87:28-35.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Ed. Chapman & Hall. New York. 511 p.

- Avise, J. C., R. A. Lansman y R. O. Shade. 1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial ADN sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, 92: 279-295.
- Baker, R. H., M. W. Baker, J. D. Johnson y R. G. Webb. 1981. New records of mammals and reptiles from northwestern Zacatecas, Mexico. *Southwestern Naturalist*, 25: 568-569.
- Barratt, E. M., Gurnell, J. Malarky, G. Deaville, R. y Bruford, M. W. 1999. Genetic structure of fragmented populations of red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *Molecular Ecology*, 8(12): S55-S63.
- Bayona-Bafaluy, M. P., Acin-Perez, R., Mullikin, J. C., Park, J. S., Moreno-L., R., Hu, P., Perez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Bai, Y. y Enriquez, J. A. 2003. Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 31(18): 5349-5355.
- Bennett, E. T. 1833. Characters of new species of mammalia from California. *Proceedings of Zoological Society of London*, pp. 39-42.
- Benson, A. D., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, B. A. Rapp y D. L. Wheeler. 2002. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 17-20.
- Best, T. L. y H. H. Thomas. 1991. *S. madrensis*. *Mammalian Species*. No. 278. pp. 1-2.
- Birky, C. W., P. Fuerst y T. Maruyama. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121: 613-627.
- Black. C. C. 1963. A review of the North American Tertiary Sciuridae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 130: 109-248.

- Bridgewater, D. D. 1966. Laboratory breeding, early growth, development and behavior of *Citellus tridecemlineatus* (Rodentia). *Southwestern Naturalist*, 11: 325-337.
- Brown, G. G., G. Gadaleta, G. Pepe, C. Saccone y E. Sbisà. 1986. Structural conservation and variation in the D-Loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*, 192: 503-511.
- Bryant, M. D. 1945. Phylogeny of Nearctic Sciuridae. *American Midland Naturalist*, 33: 257-390.
- Cabot, E. 1997. The Eyeball Sequence Editor, Version 3.1. DOS protected mode version.
- Campbell III, M. T. y T. W. Clark. 1981. Colony characteristics and vertebrate associates of white-tailed and black-tailed prairie dogs in Wyoming. *American Midland Naturalist*, 105(2):269-276.
- Cardini, A. 2003. The geometry of the marmot (Rodentia: Sciuridae) mandible: Phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Biology*, 52(2): 186-205.
- Ceballos, G. y D. E. Wilson. 1985. *Cynomys mexicanus*. *Mammalian Species*, 248:1-3.
- Ceballos, G. y E. Mellink. 1990. Distribución y estatus de los perros llaneros (*Cynomys mexicanus* y *C. ludovicianus*) en México. Pp. 327-344. En: J. L. Camarillo R. y F. Rivera A. (Comp.). Áreas naturales protegidas y especies en extinción. Serie ecológica. U.N.A.M. 1:1-374.
- Ceballos, G. y J. Pacheco. 2000. Los perros llaneros de Chihuahua: Importancia biológica y conservación. *Biodiversitas*, 31. 1-5 p.

- Cilia, V., B. Lafay y R. Christen. 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*, 13(3): 451-461.
- CITES. 2001. Database of listed species. Disponible en <http://www.cites.org/CITES/common/dbase/fauna/index.shtml>.
- Corbet, G. B. 1978. The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. British Museum (Natural History), London. 314 p.
- Daley, J. G. 1992. Population reductions and genetic variability in black tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Management*, 56(2): 212-220.
- Dalquest, W. W. 1967. Mammals of the Pleistocene Slaton local fauna of Texas. *Southwestern Naturalist*, 12: 1-30.
- Demboski, J. R., B. K. Jacobsen y J. A. Cook. 1998. Implications of cytochrome b sequence variation for biogeography and conservation of the northern flying squirrels (*Glaucomys sabrinus*) of the Alexander Archipelago, Alaska. *Canadian Journal of Zoology*, 76(9): 1771-1777.
- Desalle, R. T. Freedman, E. M. Prager y A. C. Wilson. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 26: 157-164.
- Dodgson, J. B., H. H. Cheng y R. Okimoto. 1997. DNA Marker Technology: A Revolution in Animal Genetics. *Poultry Science*, 76: 1108-1114.
- Elliott, Ch. L. y J. T. Flinders. 1991. *Spermophilus columbianus*. *Mammalian Species*. No. 372. p. 1-9.

- Esposti, D. M., S. De Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Patarnello y A. Meyer. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143: 243-271.
 - Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 368-376.
 - Fitzgerald, J. P. y R. R. Lechleitner. 1974. Observations of the biology of Gunnison's prairie dog in central Colorado. *American Midland Naturalist*, 92: 146-163.
 - Forey, L. P., C. J. Humphries, I. J. Kitching, R. W. Scotland, D. J. Siebert y D. M. Williams. 1992. *Cladistics. A practical course in systematics*. Clarendon Press – Oxford. 191 p.
 - Green, M. 1960. A tertiary *Cynomys* from South Dakota. *Journal of Paleontology*, 34: 545-547.
 - Gremmell, N. J., P. S. Western, J. M. Watson y J. A. Marshall. 1996. Evolution of the Mammalian Mitochondrial Control Region-Comparisons of Control Region Sequences Between Monotreme and Therian Mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 13(6): 798-808.
 - Grivell, L. A. 1983. ADN mitocondrial. *Investigación y Ciencia*. No. 80. 46-58 p.
- Hall, E. R. 1981. *The mammals of North America*. Second edition. John Wiley & Sons, New York. 1181 p.
- Harris, A. H. y J. S. Findley. 1964. Pleistocene-Recent fauna of the Isleta caves, Bernalillo County, New Mexico. *American Journal of Science*, 262: 114-120.

- Hassouna, N. B. Michot y J. P. Bachellerie. 1984. The complete nucleotide sequence of mouse 28s RNA gene. Implications for the process of size increase of large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 12: 3563-3583.
- Herron, M. D., T. A. Castoe y Ch. L Parkinson. En prensa. Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- Hibbard, C. W. 1942. Pleistocene mammals from Kansas. *Bulletin of State Geological Surv. Kansas*, 41: 261-269.
- Hight, M. E., M. Goodman y W. Prychodko. 1974. Immunological studies of the Sciuridae. *Systematic Zoology*, 23: 12-25.
- Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (Eds.). 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer. Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 2a. edition. 655 p.
- Hoffmann, R. S., C. G. Anderson, R. W. Thorington Jr. y L. R. Heaney. 1993. Familia Sciuridae. En: Wilson, D. E., Reeder, D. M.(Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp. 419-466.
- Hollister, N. 1916. A systematic account of the prairie dogs. *North American Fauna*. No. 40: 1-256.
- Hoogland, J. L. 1995. *The black-tailed prairie dog: social life of a borrowing mammal*. The University of Chicago Press. 557 p.

- Howell, N. y K. Gilbert. 1988. Mutational analysis of mouse mitochondrial cytochrome b gene. *Journal of Molecular Evolution*, 203: 607-618.
- Irwin, D. M., T. D. Kocher y A. C. Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
- Ittig, R. E. G. y C. N. Gardenal. 2002. Haplotype diversity of the mitochondrial DNA D-Loop Region in *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae) detected by PCR-RFLP. *Biochemical Genetics*, 40(9/10): 293-302.
- Jackson, D. A., J. Barlett y P. R. Cook. 1996. Sequences attaching loops of nuclear and mitochondrial DNA to underlying structures in humans cells: the role of transcription units. *Nucleic Acids Research*, 24: 1212-1219.
- Jenkins, S. H. y B. D. Eshelman. 1984. *Spermophilus beldingi*. *Mammalian Species*. No. 221. p. 1-8.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 2: 87-90.
- Kocher, T. D., A. M. Meyer, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca y A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Evolution*, 86: 6196-6200.
- Kruckenhauser, L., W. Pinsker, E. Haring y W. Arnold. 1999. Marmot phylogeny revisited: Molecular evidence for a diphyletic origin of sociality. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 37(1): 49-56.

- Larizza, A., G. Pesole, A. Reyes, E. Sbisà y C. Saccone. 2002. Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-Loop region in rodents. *Journal of Molecular Evolution*, 54: 145-155.
- Lehninger, A. 1995. *Principios de Bioquímica*. Ed. Omega. 1117 p.
- Lewin, B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press. 1272 p.
- Llorente-Bousquets, J. e I. V. Luna. 1994. *Taxonomía biológica*. Capítulo IX. Ediciones científicas universitarias. México, D.F. 626 p.
- López-Caballero, E. J. y Pérez-Suárez, G. 1999. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26: 45-56.
- Maddison, D.R., W. P. Maddison, K.-S. Schulz, T. Wheeler y J. Frumkin. 2001. The Tree of Life Web Project. <http://tolweb.org>
- Martin. A. P. y S. R. Palumbi. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 90: 3172-3176.
- Matson, C. W. y R. J. Baker. 2001. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of red-backed voles (*Clethrionomys*). *Molecular Biology and Evolution*, 18(8): 1494-1501.
- McCampbell, S. C. 1926. A new ground squirrel for Colorado. *Journal of Mammalogy*, 7: 60.

- McCullough, A. D. y R. K. Chesser. 1987. Genetic variation among populations of the Mexican prairie dog. *Journal of Mammalogy*, 68(3): 555-560.
- Mercer, J. M. y V. L. Roth. 2003. The Effects of Cenozoic Global Change on Squirrel Phylogeny. *Science*, 299(5612): 1568-1572.
- Merriam, C. H. 1892. Description of a new prairie dog (*Cynomys mexicanus*) from Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 7: 157-158.
- Meyer, A. 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution*, 9(8): 278-280.
- Mitchell, P. 1976. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology*, 62: 327-367.
- Moritz, C., T. E. Dowling y W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18:269-292.
- Moritz, C., Shneider, C. J. y Wake, D. B. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzi* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41:273-291.
- Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3: 401-411.
- Nadler, C. F., N. N. Vorontsov, R. S. Hoffman, I. I. Formichova y C. F. Nadler Jr. 1982. Evolution in ground squirrels. II. Biochemical comparisons in holarctic populations of *Spermophilus*. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 47: 198-215.

- Nadler, C. F. y C. E. Hughes. 1966. Chromosomes and taxonomy of the ground squirrel subgenus *Ictidomys*. *Journal of Mammalogy*, 47:46-53.
- Nash, J. H. E. 1991. DNAfrag version 3.03. National Research Council of Canada.
- Oshida, T. y R. Masuda. 2000. Phylogeny and zoogeography of six squirrel species of genus *Sciurus* (Mammalia, Rodentia) inferred from cytochrome b gene sequences. *Zoological Science Tokyo*, 17(3): 405-409.
- Oshida, T., L. K. Lin, H. Yanagawa, H. Endo y R. Masuda. 2000. Phylogenetic relationships among six flying squirrel genera, inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Zoological Science Tokyo*, 17(4): 485-489.
- Oshida, T., K. Ikeda, K. Yamada y R. Masuda. 2001. Phylogeography of the Japanese giant flying squirrel, *Petaurista leucogenys*, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Science Tokyo*, 18(1): 107-114.
- Page, M. D. R. y E. D. Holmes. 1998. *Molecular evolution: A phylogenetic approach*. Blackwell Science. Oxford. 346 p.
- Palumbi, S., A. Martín, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice y G. Grabowski. 1991. *The simple fool's guide to PCR*. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii. Honolulu. 44 p.
- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton y P. A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2): 361-382.

- Pesole, G., C. Gissi, A. De Chirico y C. Saccone. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 427-434.
- Pizzimenti, J. J. 1975. Evolution of the prairie dog genus *Cynomys*. *Occasional Papers of the Museum Natural History, University of Kansas*, 39:1-73.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*, 14(9): 817-818.
- Prager, E. M., R. D. Sage. U. Gyllensten, W. K. Thomas, R. Hübner, C. S. Jones, L. Noble, J. B. Searle y A. C. Wilson. 1993. Mitochondrial DNA sequence diversity and the colonization of Scandinavia by house mice from East Holstein. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50: 85-122.
- Rand, D. M. 1993. Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *Journal of Molecular Evolution*, 37: 281-295.
- Reyes, A., E. Nevo y C. Saccone. 2003. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of subterranean mole rats *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Israel. *Molecular Biology and Evolution*, 20(4): 622-632.
- Rickart, E. A. 1987. *Spermophilus townsendii*. *Mammalian Species*. No. 268. p. 1-6.
- Rickart, E. A. y E. Yensen. 1991. *Spermophilus washingtoni*. *Mammalian Species*. No. 371. p. 1-5.
- Roberts. R. J. y D. Macelis. 2001. The restriction enzyme data base. *Nucleic Acids Research*, 29: 268-269.

- Rzedowski, J. 1990. Vegetación potencial, IV.8.2. En: Atlas Nacional de México. Vol. II. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- Saccone, C., M. Attimonelli y E. Sbisà. 1987. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-Loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 26: 205-211.
- Saccone, C., G. Pesole y E. Sbisà. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33: 83-91.
- Sbisà, E., F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole y C. Saccone. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205: 125-140.
- Schaffer, H.E. y R. R. Sederoff. 1981. Least squares fit of DNA fragment length to gel mobility. *Analytical Biochemistry*, 115: 113-122.
- Schneider, C. J., M. Cunningham y C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the Wet Tropics rainforests of Australia. *Molecular Ecology*, 7: 487-498.
- Smith, M. F. y J. L. Patton. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American Akodontine Rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution*, 8: 85-103.
- Smith, M. F. y J. L. Patton. 1993. The diversification of South American murid rodents: Evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of Linnean Society*, 50:149-177.

- Smith, M. F. y J. L. Patton. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of Sigmodontine rodents in South American: evidence from cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution*, 6(2): 89-128.
- Snow, A. A. y P. G. Parker. 1998. Molecular markers for population biology. *Ecology*, 79(2): 359-360.
- Spotorno, A. E., L. I. Walker, S. V. Flores, M. Yevenes, J. C. Marín y C. Zuleta. 2001. Evolución de los filotinos (Rodentia, Muridae) en los Andes del sur. *Revista chilena de historia natural*, 74(1): 151-166.
- Spradling, A. T., M. S. Hafner y J. W. Demastes. 2001. Differences in rate of cytochrome-b evolution among species of rodents. *Journal of Mammalogy*, 82(1): 65-80.
- Streubel, D. P. 1975. Behavioral features of sympatry of *Spermophilus spilosoma* and *Spermophilus tridecemlineatus* and some aspects of the life history of *S. spilosoma*. University of Northern Colorado, Greeley. 130 p.
- Streubel, D. P. y J. P. Fitzgerald. 1978. *Spermophilus spilosoma*. *Mammalian Species*, No. 101: 1-4.
- Sullivan, J., E. Arellano, y D. S. Rogers. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *American Naturalist*, 155: 755-768.
- Sumrell, F. 1949. A life history study of the ground squirrel *Citellus spilosoma major* (Merriam). M.S. thesis, University of New Mexico, Albuquerque, 100 p.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Tagliaro, C. H., M. P. Schneider, H. Schneider, I. C. Sampaio y M. J. Stanhope. 1997. Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 674-684.
- Tatusova, T. A. y T. L. Madden. 1999. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letter*, 174: 247-250.
- Treviño-Villarreal, J. y W. E. Grant. 1998. Geographic range of the endangered mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *Journal of Mammalogy*, 79 (4):1273-1287.
- Vaughan, A.T. 1988. Mamíferos. Ed. interamericana. México. 587 p.
- Vincze, T., J. Posfai y R. J. Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31: 3688-3691.
- Walberg, M. W. y D. A. Clayton. 1981. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-Loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 9: 5411-5421.
- Walker, D. y J. C. Avise. 1998. Principles of phylogeography as illustrated by freshwater and terrestrial turtles in the southeastern United States. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 23-58.
- Wallace, B. 1986. Mitochondrial genes and disease. *Hospital Practice*, 21: 77-92.
- Waring, G. H. 1970. Sound communications of black-tailed, white tailed, and Gunnison's prairie dogs. *American Midland Naturalist*, 83: 167-185.

- Wettstein, P. J., P. Lager, L. Jin, J. States, T. Lamb y R. Chakraborty. 1994. Phylogeny of mitochondrial DNA clones in tassel eared squirrels *Sciurus aberti*. *Molecular Ecology*, 3(6): 541-550.
- Whicker, D. A. y J. K. Detling. 1988. Ecological consequences of prairie dog disturbances. *BioScience*, 38(11):778-785.
- Whitmore, D. H., T. H Thai y C. M. Craft. 1994. The largemouth bass cytochrome b gene. *Journal of Fish Biology*, 44: 637-645.
- Wiley, E. O. 1981. *Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. John Wiley, New York. 456 p.
- Yensen, E. y P. W. Sherman. 1997. *Spermophilus brunneus*. *Mammalian Species*. No. 560. pp. 1-5.
- Zhu, D., B. G. M. Jamieson, A. Hugall y C. Moritz. 1994. Sequence evolution and phylogenetic signal in control region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Molecular Biology and Evolution*, 11: 672-683.

ANEXO I

Enzimas y patrones de corte basados en las secuencias obtenidas en este estudio

Región control

Las endonucleasas informativas para ésta región en *C. mexicanus* y *S. pilosoma* se muestran a continuación.

Enzimas y patrones de corte para *C. mexicanus*.

	<i>Cynomys mexicanus</i>	
	Individuo 1 (SLP)	Individuo 2 (Coahuila)
Enzimas	Longitud Esperada	Longitud Esperada
Fat I (5'-↓CATG-3')	400	400
	232	326
	102	102
	94	74
	74	49
	49	47
	47	
Nla III (5'-CATG↓-3')	400	400
	232	326
	102	102
	94	70
	70	51
	51	49
	49	

Enzimas y patrones de corte para *S. pilosoma*.

	<i>Spermophilus pilosoma</i>	
	Individuo 1 (SLP)	Individuo 2 (Coahuila)
Enzimas	Longitud Esperada	Longitud Esperada
BfuC I (5'-↓GATC-3')	494	464
	363	363
	136	136

		32
Dpn I (5'-G ^m A↓TC-3')	494 365 134	494 365 134 32
Mbo I (5'-↓GATC-3')	494 363 136	464 363 136 32
Sau3A I (5'-↓GATC-3')	494 363 136	464 363 136 32
Taq I (5'-T↓CGA-3')	675 320	674 236 83

Citocromo b

Las endonucleasas informativas para este gen en *C. mexicanus* y *S. pilosoma* se muestran a continuación.

Enzimas y patrones de corte para *C. mexicanus*

	<i>Cynomys mexicanus</i>	
	Individuo 1 (SLP)	Individuo 2 (Coahuila)
Enzimas	Longitud Esperada	Longitud Esperada
Alu I (5'-AG↓CT-3')	370 184 161	370 343
HpyCH4V (5'-TG↓CA-3')	309 181 124 70 31	309 192 181 31
Rsa I (5'-GT↓AC-3')	366 278 71	435 278

Enzimas y patrones de corte para *S. pilosoma*

	<i>Spermophilus pilosoma</i>	
	Individuo 1 (SLP)	Individuo 2 (Coahuila)
Enzimas	Longitud Esperada	Longitud Esperada
Alu I (5'-AG↓CT-3')	370	370
	344	256
		88
Bfa I (5'-C↓TAG-3')	424	424
	175	175
	115	85
		30
BfuC I (5'-↓GATC-3')	511	511
	139	82
	64	64
		57
Dpn I (5'-G ^m A↓TC-3')	511	511
	137	82
	66	66
		55
Sau3A I (5'-↓GATC-3')	511	511
	139	82
	64	64
		57

Anexo II

Secuencias del gen codificante de proteínas (citocromo b)

<i>S. lis</i>	1	ATCGTTAATCACTCTTTTATTGACCTCCCAGCTCCCTCAAACATCTCAGCTTGATGAAAC	60
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	1	ATCATCAACCACTCTTTTATTGATTTACCTGCACCTTCCAATATTTCCGCATGATGAAAC	60
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	1	ATCATCAACCACTCTTTTATTGATTTACCTGCACCTTCCAATATTTCCGCATGATGAAAC	60
<i>S. pilosoma</i> (Coah)	1	ATCATCAATCATTCTTTTATCGATTTACCCGCACCTTCCAACATTTCCGCATGATGAAAC	60
<i>S. pilosoma</i> (SLP)	1	ATCATCAATCATTCTTTTATCGATTTACCCGCACCTTCCAACATTTCCGCATGATGAAAC	60
<i>S. lis</i>	61	TTTGGCTCACTCCTTGGACTTTGTCTCCTAATTCAAATCTTAACCGGCCTATTTTTAGCT	120
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	61	TTTGGATCCCTACTAGGCCTCTGCCTAGCCATCCAAATCCTCACAGGATTATTTCTAGCA	120
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	61	TTTGGATCCCTACTAGGCCTCTGCCTAGCCATCCAAATCCTCACAGGATTATTTCTAGCA	120
<i>S. pilosoma</i> (Coah)	61	TTCGGATCCCTATTAGGTCTCTGCCTAGCTATTCAAATCCTCACGGGATTATTTCTAGCA	120
<i>S. pilosoma</i> (SLP)	61	TTCGGATCCCTATTAGGTCTCTGCCTAATTATTCAAATCCTCACGGGATTATTTCTAGCA	120
<i>S. lis</i>	121	ATACATTATACATCAGACACAATAACAGCTTTTTCTTCCG TCACTCACATCT GCCGAG	178
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	121	ATACATTATACATCTGACACCATAACAGCCTTCTC ATCAG TCACCCATATCT GCCGAG	178
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	121	ATACATTATACATCTGACACCATAACAGCCTTCTC ATCAG TCACCCATATCT GCCGAG	178
<i>S. pilosoma</i> (Coah)	121	ATACATTACACATCTGACACCATAACAGCCTTTTT C ATCAG TCACACATATCT GTCGAG	178
<i>S. pilosoma</i> (SLP)	121	ATACATTACACATCTGACACCATAACAGCCTTTTT C ATCAG TCACACATATCT GTCGAG	178
<i>S. lis</i>	179	ACGTGAATTATGGC TGATTAATCCGATATATACATGCCAACGGCGCTTCCCTATTCTTT	237
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	179	ATGTGAATTACGGC TGA CTTATCCGCTACATACATGCCAACGGTGCATCTATGTTTTTT	237
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	179	ATGTGAATTACGGC TGA CTTATCCGCTACATACATGCCAACGGTGCATCTATGTTTTTT	237
<i>S. pilosoma</i> (Coah)	179	ACGTTAATTACGGT TGA CTTATCCGCTATATACATGCCAATGGTGCATCAATATTTTTT	238
<i>S. pilosoma</i> (SLP)	179	ACGTTAATTACGGT TGA CTATCCGCTATATACATGCTAATGGTGCATCCATATTTTTT	238
<i>S. lis</i>	238	ATTTGTCTGTTCCCTCCATGTAGGTCGCGGCCtCTACTACGGCTCCTACACTTACTTTGAA	297
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	238	ATCTGCCTCTTTCTTCATGTAGGCCGAGGATTATACTACGGCTCATACTTACTTTGAA	297
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	238	ATCTGCCTCTTTCTTCATGTAGGCCGAGGATTATACTACGGCTCATACTTACTTTGAA	297
<i>S. pilosoma</i> (Coah)	239	ATTTGCCTCTTTCTTCATGTAGGCCGAGGATTATATTACGGCTCATATACTTACTTTGAA	297
<i>S. pilosoma</i> (SLP)	239	ATTTGCCTCTTTCTTCATGTAGGCCGAGGATTATATTATGGCTCATATACTTACTTTGAA	297

S. lis 298 ACCTGAAACATTGGAGTTATTCTTCTCTTCGCAGTAATAGCCACTGCATTCATAGGCTAT 357
C. mexicanus (Coah) 298 ACATGAAACATTGGAGTTGTCCTTTTATTCGTAGTAATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAT 357
C. mexicanus (SLP) 298 ACATGAAACATTGGAGTTGTCCTTTTATTCGTAGTAATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAT 357
S. spilosoma (Coah) 298 ACATGAAACATTGGAGTTATTCTTCTATTTCGCAGTCATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAC 357
S. spilosoma (SLP) 298 ACATGAAACATTGGAGTTATTCTTCTATTTCGCAGTCATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAT 357

S. lis 358 GTCCTTCCATGAGGACAGATATCATTTTGAGGAGCCACAGTCATTACAAATCTCCTGTCT 417
C. mexicanus (Coah) 358 GTCCTCCCCTTGAGGTCAAATATCATTCTGAGGAGCAACCGTAATTACTAATCTTTTATCT 417
C. mexicanus (SLP) 358 GTCCTCCCCTTGAGGTCAAATATCATTCTGAGGAGCAACCGTAATTACTAATCTTTTATCT 417
S. spilosoma (Coah) 358 GTTCTCCCCTGAGGCCAAATATCATTCTGGGGGGCTACCGTAATTACTAATCTTTTATCT 417
S. spilosoma (SLP) 358 GTCCTCCCCTGAGGCCAAATATCATTCTGGGGGGCTACCGTAATTACTAATCTTTTATCT 417

S. lis 418 GCTATTCCCTTATATCGGAACCACCCTAGTTGAATGAATCTGAGGCGGATTCTCAGTCGAC 477
C. mexicanus (Coah) 418 GCCATCCCATAACATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGTGGTTTCTCAGTAGAC 477
C. mexicanus (SLP) 418 GCCATCCCATAACATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGTGGTTTCTCAGTAGAC 477
S. spilosoma (Coah) 418 GCCATCCCATAATATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGCGGATTCTCAGTAGAC 477
S. spilosoma (SLP) 418 GCCATCCCATAATATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGCGGATTCTCAGTAGAC 477

S. lis 478 AAAGCAACTCTAACACGATTCTTCGCCTTCCATTTTCATCCTTCCTTTCATCGTCACAGCC 537
C. mexicanus (Coah) 478 AAAGCCACTCTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTTGTTCTTCCATTTATCGTTGCAGCC 537
C. mexicanus (SLP) 478 AAAGCCACTCTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTTGTTCTTCCATTTATCGTTGCAGCC 537
S. spilosoma (Coah) 478 AAAGCCACCCTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATTGCAGCC 537
S. spilosoma (SLP) 478 AAAGCCACCCTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATTGCAGCC 537

S. lis 538 CTAGTTATAGTACATTTATTATTCTTCCATGAAACAGGATCTAACCAACCCATCTGGCCTA 597
C. mexicanus (Coah) 538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTCTTCTCCATGAAACTGGATCAAACAACCCCTCAGGCCTT 597
C. mexicanus (SLP) 538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTCTTCTCCATGAAACTGGATCAAACAACCCCTCAGGCCTT 597
S. spilosoma (Coah) 538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTTTTCTCCATGAAACTGGATCAAACAACCCCTCAGGCCTT 597
S. spilosoma (SLP) 538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTTTTCTCCATGAAACTGGATCAAACAACCCCTCAGGCCTT 597

S. lis 598 ATCTCCGATTCAGACAAAATCCCATTCACCCCTTATTATACTATCAAAGACATTTTAGGC 657
C. mexicanus (Coah) 598 ATTTCTGACTCAGACAAAATTCCTTTTCACCCATATTACACCATCAAAGATATCCTTGGA 657
C. mexicanus (SLP) 598 ATTTCTGACTCAGACAAAATTCCTTTTCACCCATATTACACCATCAAAGATATCCTTGGA 657
S. spilosoma (Coah) 598 GTTTCTGACTCAGATAAAAATTCCTTTTCACCCATACTACACTATCAAAGATATTCTCGGA 657
S. spilosoma (SLP) 598 GTTTCTGACTCAGATAAAAATTCCTTTTCACCCATACTACACTATCAAAGATATTCTCGGG 657

S. lis 658 GTTCTTCTACTTCTTCTTCTATTTATAACCTTAGTTCTATTCTCACCAGACCTACT 713
C. mexicanus (Coah) 658 GTCCTCCTTCTTATTATAGCCCTAATAAATCTAGTCCTATTTTCACCTGACCTTTT 713
C. mexicanus (SLP) 658 GTCCTCCTTCTTATTATAGCCCTAATAAATCTAGTCCTATTTTCACCTGACCTTTT 713
S. spilosoma (Coah) 658 ATCCTCCTCCTCATTATAGCCCTAATGACCCTAATCCTATTTTCACCTGACCTTCT 713
S. spilosoma (SLP) 658 ATCCTCCTCCTCATTATAGCCCTAATGACCCTAATCCTATTTTCACCTGACCTTCT 713

ANEXO III

Secuencias de ADN para el gen citocromo b, con sus respectivos aminoácidos. En la parte inicial se muestra la secuencia de inicio de *Sciurus vulgaris* (NC_002369) para situar el segmento del gen con el que se trabajo. — Dominio extramembranal. — — Dominio transmembranal. == Dominio intermembranal.

	<i>Sciurus vulgaris</i>	atgacaaaatccgcaaaacccaccctctaatacaaa M T N I R K T H P L I K
<i>S. lis</i>	1 atcgtaaatacactcttttatat	cctcccagctccctcaaacatctcagcttgatgaaac 0 I V N H S F I D L P A P S N I S A W W N
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	1 ATCATCAACCACTCTTTTATTGATTACCTGCACCTTCCAATATTTCCGCATGATGAAAC	0 I I N H S F I D L P A P S N I S A W W N
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	1 ATCATcTACCACTCTttTATTGATTACCTGCaCCTTcAGTATTtCCGCATGATGAAaC	0 I I N H S F I D L P A P S N I S A W W N
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	1 ATCATCAATCATTTCTTTTATCGATTTACCCGCACCTTCCAACATTTCCGCATGATGAAAC	0 I I N H S F I D L P A P S N I S A W W N
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	1 ATCATCAATCATTTCTTTTATCGATTTACCCGCACCTTCCAACaTTTCCGCATGATGAAAC	0 I I N H S F I D L P A P S N I S A W W N
<i>S. lis</i>	61 tttggctcactccttggactttgtctcctaattcaaatcttaaccggcctatTTTTagct	20 F G S L L G L C L L I Q I L T G L F L A
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	61 TTTGGATCCCTACTAGGCCTCTGCCTAGCCATCCAATCCTCACAGGATTATTTCTAGCA	20 F G S L L G L C L A I Q I L T G L F L A
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	61 TTTGGATCCGTACTAGGCCTCTGCCTAGCCaTCCAATCCTCaGGATTATTTCTAGCA	20 F G S L L G L C L A I Q I L T G L F L A
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	61 TTCGGATCCCTATTAGGTCTCTGCCTAGCTATTCAAATCCTCACGGGATTATTTCTAGCA	20 F G S L L G L C L A I Q I L T G L F L A
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	61 TTCGGATCCCTATTAGGTCTCTGCCTAATTATTCAAATCCTCACGGGATTATTTCTAGCA	20 F G S L L G L C L I I Q I L T G L F L A
<i>S. lis</i>	121 atacattatacatcagacacaataacagctttttcttccgctcactcacatctgccgagac	40 M H Y T S D T M T A F S S V T H I C R D
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	121 ATACATTATACATCTGACACCATAACAGCCTTCTCATCAGTCACCCATATCTGCCGAGAT	40 M H Y T S D T M T A F S S V T H I C R D
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	121 ATAcAtTAtACATcTGACAccATAACaGCCTTctCATCAGTCACCCATATCTGCCGAGAT	40 M H Y T S D T M T A F S S V T H I C R D
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	121 ATACATTACACATCTGACACCATAACAGCCTTTTTCATCAGTCACACATATCTGTGCGAGAC	40 M H Y T S D T M T A F S S V T H I C R D
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	121 ATACATTACACATCTGACACCATAACAGCCTTTTTCATCAGTCACACATATCTGTGCGAGAC	40 M H Y T S D T M T A F S S V T H I C R D
<i>S. lis</i>	181 gtgaattatggctgattaatc	cgatatatacatgccaacggcgcttccctattcttc 60 V N Y G W L I R Y M H A N G A S L F F
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	181 GTGAATTACGGCTGACTTATC	60 V N Y G W L I R Y M H A N G A S M F F
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	181 GTGAATTACGGCTGACTtATC	60 V N Y G W L I R Y M H A N G A S M F F
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	181 GTTAATTACGGtTGACTTATC	60 V N Y G W L I R Y M H A N G A S M F F
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	181 GTTAATTACGGTTGACTCATC	60 V N Y G W L I R Y M H A N G A S M F F

<i>S. vulgaris</i>	238	atttgtctgttctccatgta	ggtcgcggcctctactacggctcctacacttacttt	gaa
	79	I C L F L H V	G R G L Y Y G S Y T Y F	E
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	238	ATCTGCCTCTTTCTTCATGTA	GGCCGAGGATTATACTACGGCTCATACTTACCTT	GAA
	79	I C L F L H V	G R G L Y Y G S Y T Y L	E
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	238	ATCTGCCTCTTTCTTCATGTA	GGCCGAGGATTATACTACGGCTCATACTTACTTT	GAA
	79	I C L F L H V	G R G L Y Y G S Y T Y F	E
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	238	ATTTGCCTCTTTCTTCATGTA	GGCCGAGGATTATATTACGGCTCATATACTTACTTT	GAA
	79	I C L F L H V	G R G L Y Y G S Y T Y F	E
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	238	ATTTGCCTCTTTCTTCATGTA	GGCCGAGGATTATATTATGGCTCATATACTTACTTT	GAA
	79	I C L F L H V	G R G L Y Y G S Y T Y F	E

<i>S. vulgaris</i>	298	acctgaaacattggagttattcttctcttcgcagtaaatagccactgcattcataggctat
	99	T W N I G V I L L F A V M A T A F M G Y
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	298	ACATGAAACATTGGAGTTGTCCTTTTATTCGTAGTAATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAT
	99	T W N I G V V L L F V V M A T A F M G Y
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	298	ACATGAAACATTGGAGTTGTCCTTTTATTCGTAGTAATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAT
	99	T W N I G V V L L F V V M A T A F M G Y
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	298	ACATGAAACATTGGAGTTATTCTTCTATTTCGAGTCATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAT
	99	T W N I G V I L L F A V M A T A F M G Y
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	298	ACATGAAACATTGGAGTTATTCTTCTATTTCGAGTCATAGCCACAGCTTTCATAGGCTAT
	99	T W N I G V I L L F A V M A T A F M G Y

<i>S. vulgaris</i>	358	gtccttccatga	ggacagatatcattttgaggagccacagtcattacaaatctcctgtct
	119	V L P W	G Q M S F W G A T V I T N L L S
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	358	GTCCTCCCTTGA	GGTCAAATATCATTCTGAGGAGCAACCGTAATTACTAATCTTTTATCT
	119	V L P W	G Q M S F W G A T V I T N L L S
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	358	GTCCTCCCTTGA	GGTCAAATATCATTCTGAGGAGCAACCGTAATTACTAATCTTTTATCT
	119	V L P W	G Q M S F W G A T V I T N L L S
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	358	GTTCTCCCCTGA	GGCCAAATATCATTCTGGGGGGCTACCGTAATTACTAATCTTTTATCT
	119	V L P W	G Q M S F W G A T V I T N L L S
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	358	GTCCTCCCCTGA	GGCCAAATATCATTCTGGGGGGCTACCGTAATTACTAATCTTTTATCT
	119	V L P W	G Q M S F W G A T V I T N L L S

<i>S. vulgaris</i>	418	gctattccttatatcggaaccaccctagttgaatgaatctgaggcggattctcagtcgac
	139	A I P Y I G T T L V E W I W G G F S V D
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	418	GCCATCCCATACATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGTGGTTTCTCAGTAGAC
	139	A I P Y I G T T L V E W I W G G F S V D
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	418	GCCATCCCATACATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGTGGTTTCTCAGTAGAC
	139	A I P Y I G T T L V E W I W G G F S V D
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	418	GCCATCCCATATATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGCGGATTCTCAGTAGAC
	139	A I P Y I G T T L V E W I W G G F S V D
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	418	GCCATCCCATATATCGGTACAACCTTAGTAGAATGAATTTGAGGCGGATTCTCAGTAGAC
	139	A I P Y I G T T L V E W I W G G F S V D

<i>S. lis</i>	478 aaagcaactctaacacgattc	ttcgccttccatttcaccttcctttcatcgtcacagcc
	159 K A T L T R F	F A F H F I L P F I V T A
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	478 AAAGCCACTCTAACACGATTC	TTCGCATTCCACTTTGTTCTTCCATTTATCGTTGCAGCC
	159 K A T L T R F	F A F H F V L P F I V A A
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	478 AAAGCCACTCTAACACGATTC	TTCGCATTCCACTTTGTTCTTCCATTTATCGTTGCAGCC
	159 K A T L T R F	F A F H F V L P F I V A A
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	478 AAAGCCACCCTAACACGATTC	TTTCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATTGCAGCC
	159 K A T L T R F	F A F H F I L P F I I A A
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	478 AAAGCCACCCTAACACGATTC	TTTCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATTGCAGCC
	159 K A T L T R F	F A F H F I L P F I I A A

<i>S. lis</i>	538 ctagtatatagtacatttattattccttcat	gaaacaggatctaacaacccatctggccta
	179 L V M V H L L F L H	E T G S N N P S G L
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTCTTCCAT	GAAACTGGATCAAACAACCCCTCAGGCCTT
	179 L V M V H L L F L H	E T G S N N P S G L
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTCTTCCAT	GAAACTGGATCAAACAACCCCTCAGGCCTT
	179 L V M V H L L F L H	E T G S N N P S G L
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTTTTCCAT	GAAACTGGATCAAACAACCCCTTCCAGGCCTT
	179 L V M V H L L F L H	E T G S N N P S G L
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	538 CTAGTCATAGTCCACCTTCTTTTCCAT	GAAACTGGATCAAACAACCCCTTCCAGGCCTT
	179 L V M V H L L F L H	E T G S N N P S G L

<i>S. lis</i>	598 atctccgattcagacaaaatccattccacccttattatactatcaagacatt	ttaggc
	199 I S D S D K I P F H P Y Y T I K D I	L G
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	598 ATTTCTGACTCAGACAAAATTCCTTTTACCCATATTACACCATCAAAGATATC	CTTGGA
	199 I S D S D K I P F H P Y Y T I K D I	L G
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	598 ATTTCTGACTCAGACAAAATTCCTTTTACCCATATTACACCATCAAAGATATC	CTTGGA
	199 I S D S D K I P F H P Y Y T I K D I	L G
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	598 GTTTCTGACTCAGATAAAATTCCTTTTACCCATACTACACTATCAAAGATATT	CTCGGG
	199 V S D S D K I P F H P Y Y T I K D I	L G
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	598 GTTTCTGACTCAGATAAAATTCCTTTTACCCATACTACACTATCAAAGATATT	CTCGGG
	199 V S D S D K I P F H P Y Y T I K D I	L G

<i>S. lis</i>	658 gttcttctacttcttcttctatttataaccttagttctattctcaccagacctact
	219 V L L L L L L F M T L V L F S P D L
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	658 GTCCTCCTTCTTATTATAGCCCTAATAATTCTAGTCCTATTTTACCTGACCTTTT
	219 V L L L I M A L M I L V L F S P D L
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	658 GTCCTCCTTCTTATTATAGCCCTAATAATTCTAGTCCTATTTTACCTGACCTTTT
	219 V L L L I M A L M I L V L F S P D L
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	658 ATCCTCCTCCTCATTATAGCCCTAATGACCCTAATCCTATTTTACCTGACCTTCT
	219 I L L L I M A L M T L I L F S P D L
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	658 ATCCTCCTCCTCATTATAGCCCTAATGACCCTAATCCTATTTTACCTGACCTTCT
	219 I L L L I M A L M T L I L F S P D L

ANEXO IV

Secuencias de aminoácidos del gen citocromo b.

En gris se presentan las diferencias entre las secuencias

<i>Sciurus lis</i>	0	IINHSFIDL PAPSNI SAWW NFGSLLGLCLIIQILTGLFLAMHYTSDTMTAFSSVTHICRD
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	0	IINHSFIDL PAPSNI SAWW NFGSLLGLCLIIQILTGLFLAMHYTSDTMTAFSSVTHICRD
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	0	IINHSFIDL PAPSNI SAWW NFGSLLGLCLIIQILTGLFLAMHYTSDTMTAFSSVTHICRD
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	0	IINHSFIDL PAPSNI SAWW NFGSLLGLCLIIQILTGLFLAMHYTSDTMTAFSSVTHICRD
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	0	IINHSFIDL PAPSNI SAWW NFGSLLGLCLIIQILTGLFLAMHYTSDTMTAFSSVTHICRD
<i>Sciurus lis</i>	61	VNYGWLIRYMHANGASMFFICLFLHVGRGLYYGSYTYFETWNIGVILLFAVMATAFMGY
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	61	VNYGWLIRYMHANGASMFFICLFLHVGRGLYYGSYTYFETWNIGVILLFAVMATAFMGY
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	61	VNYGWLIRYMHANGASMFFICLFLHVGRGLYYGSYTYFETWNIGVILLFAVMATAFMGY
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	61	VNYGWLIRYMHANGASMFFICLFLHVGRGLYYGSYTYFETWNIGVILLFAVMATAFMGY
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	61	VNYGWLIRYMHANGASMFFICLFLHVGRGLYYGSYTYFETWNIGVILLFAVMATAFMGY
<i>Sciurus lis</i>	120	VLPWGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTTLVEWIWGGFSVDKATLTRFFAFHFILPFIIAA
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	120	VLPWGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTTLVEWIWGGFSVDKATLTRFFAFHFILPFIIAA
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	120	VLPWGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTTLVEWIWGGFSVDKATLTRFFAFHFILPFIIAA
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	120	VLPWGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTTLVEWIWGGFSVDKATLTRFFAFHFILPFIIAA
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	120	VLPWGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTTLVEWIWGGFSVDKATLTRFFAFHFILPFIIAA
<i>Sciurus lis</i>	180	LVMVHLLFLHETGSNNPSGLVSDSDKIPFHPYYTIKDILGILLIMALMTLILFSPDL
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	180	LVMVHLLFLHETGSNNPSGLVSDSDKIPFHPYYTIKDILGILLIMALMTLILFSPDL
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	180	LVMVHLLFLHETGSNNPSGLVSDSDKIPFHPYYTIKDILGILLIMALMTLILFSPDL
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	180	LVMVHLLFLHETGSNNPSGLVSDSDKIPFHPYYTIKDILGILLIMALMTLILFSPDL
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	180	LVMVHLLFLHETGSNNPSGLVSDSDKIPFHPYYTIKDILGILLIMALMTLILFSPDL

ANEXO V

Secuencias de la región control

	1 ---TC-----TCA	5
Sciurus vulgaris	1 CACTCGACCAGTTT	14
S. spilosoma (Coah)	1 CACTCGACCAGTTT	14
S. spilosoma (SLP)	1 CACTCGTCCAATCA	14
C. mexicanus (Coah)	1 CACTCGTCCAATCA	14
C. mexicanus (SLP)	1 CACTCGTCCAATCA	14
6 C-----ATTGA-----TGTC--TAT-GTAATTCGTGCA----TT-A-----ATGCATG		40
15 CTTAAATCTTGACTTTTATGTCCCTATCAACTTTCATTCAACAATTCACCTCTATGTATA		74
15 CTTAAATCTTGACTTTTATGTCCCTATCAACTTTCATTCAACAATTCACCTCTATGTATA		74
15 CTTAAATATTGACTCTTATGTCCCTATCGGCTTTCATCCAACAACGCACC--TATGTATA		72
15 CTTAAATATTGACTCTTATGTCCCTATCGGCTTTCATCCAACAACGCACC--TATGTATA		72
41 TCCA-CATTAATTAATGGT-ACAGTACATAATAAT-AAG-AAAGTACATAGAACATATC		96
75 ACGTGCATTATATGCTTTA CCCCATTAAACCACCATTAAATCCATGTACATAGGACATTAT		134
75 ACGTGCATTATATGCTTTA CCCCATTAAACCACCATTAAATCCATGTACATAGGACATTAT		134
73 TCGTGCATTAATTGCACCTCCACATTAAGCCATTATTAATCCATGTACATAGGACATTAT		132
73 TCGTGCATTAATTGCACCTCCACATTAAGCCATTATTAATCCATGTACATAGGACATTAT		132
97 ATGTTTAATCAACATTA AAAACCTC-CACCACATGCTTATAAGCATGCACATTAATACTCA		155
135 ATGTTTAATCAACATTAATAA CACTCTCCCCATGCATATAAGCACGTTTCAT-AATACTTA		193
135 ATGTTTAATCAACATTAATAA CACTCTCCCCATGCATATAAGCACGTTTCAT-AATACTTA		193
133 ATGTTTAATCAACATTAATAA TACTCTCCCCATGCATATAAGCACGTTTCAT-AATACTAA		191
133 ATGTTTAATCAACATTAATAA TACTCTCCCCATGCATATAAGCACGTTTCAT-AATACTAA		191
156 CATAGTACATAAAACATTAGGATTTAACCCTCC-ACATTTAAAGCCCCACAACATGAAT		213
194 CATAGTACATAATACAGTAC--CTTATCCCTTC-ACATCCCATGCCTGC CAATACGACA		249
194 CATAGTACATAATACAGTAC--CTTATCCCTTC-ACATCCCATGCCTGC CAATACGACA		249
192 CATAGTACATAATACATTAC--TCCAGCCC GCCACAATAAATGCTCGT CAATACGGCA		248
192 CATAGTACATAATACATTAC--TCCAGCCC GCCACAATAAATGCTCGT CAATACGGCA		248
214 ATCCTTTGCCCCATTAC-ATTCTTTATATTGCATAGCACATAATATTCACTGGCGGTACA		272
250 GTTCTTAACCC-ATGATTACTATTGACAGTACATAGTACATTCAAATCACTGGCGGCACA		308
250 GTGCTTAACCC-ATGACTACTATTGACAGTACATAGTACATTCAAATCACTGGCGGCACA		308
249 GTGATCTTCCA-ATGGACATGGTTC CAGTACATAGCACATT CATATCACTGGCGGTACA		307
249 GTGATCTTCCA-ATGGACATGGTTC CAGTACATAGCACATT CATATCACTGGCGGTACA		307
273 TACCCCATTTAAGTCATAAA CTTCTCGT-CCAAATGACTATCCCCTTCCAACGGTGGT		331
309 TACCACATTTA-GTCATAAA TCTTCTTGTTCCAAATGACTATCCCCTACCAATTTTGGT		367
309 TACCACATTTA-GTCATAAA TCTTCTCGTTCCAAATGACTATCCCCTACCAATTTTGGT		367
308 TACCACATTCA-GTCATAAA TCTTCTCGATCCAAATGACTATCCCCTACCAATGTTGGT		366
308 TACCACATTCA-GTCATAAA TCTTCTCGATCCAAATGACTATCCCCTACCAATGTTGGT		366

<i>Sciurus vulgaris</i>	332	CTCTTAATCTACCTACCTCCGTGAAATCATCAACCCGCCCGATACGTGTCCCTCT	386
<i>S. spilosoma</i> (Coah)	368	CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACCTTAATGTCCCTCT	422
<i>S. spilosoma</i> (SLP)	368	CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACCTTAATGTCCCTCT	422
<i>C. mexicanus</i> (Coah)	367	CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACCTCCGTGTCCCTCT	421
<i>C. mexicanus</i> (SLP)	367	CTCATAATCTACCAACCTCCGTGAAACCATCTACTCGCCCACCTCCGTGTCCCTCT	421
	387	TCTCGCCTGGATCCCAATTTAACTTGGGGGTGACTAACTATGCTCTTTGACAGGCATCTG	446
	423	TCTTGCTCTGATCCCAATTTAACTTGGGGGTAGCTAATAGTGATCTTTATCTGGCATCTG	482
	423	TCTTGCTCTGATCCCAATTTAACTTGGGGGTAGCTAATAGTGATTTTTATCTGGCATCTG	482
	422	TCTTGCTCTGATCCCA-TTTAACTTGGGGGTAGCTAACAATGATCTTTATCTGGCATCTG	480
	422	TCTTGCTCTGATCCCA-TTTAACTTGGGGGTAGCTAACAATGATCTTTATCTGGCATCTG	480
	447	GTTCCCTACCTCAGGGCCATGTAATGCGTTATCGCCCATACGTTCCCTTAAATAAGACAT	506
	483	GTTCCCTACCTCAGGGCCATGAACTTCATAATCGCCCACCCGTTCCCTTAAATAAGACAT	542
	483	GTTCCCTACCTCAGGGCCATGGACTTCATAATCGCCCACCCGTTCCCTTAAATAAGACAT	542
	481	GTTCCCTACCTCAGGGCCATAAACTGCATAATCGCCCACCCGTTCCCTTAAATAAGACAT	540
	481	GTTCCCTACCTCAGGGCCATGAACTGCATAATCGCCACCCGTTCCCTTAAATAAGACAT	540
	507	CACGATGGATTAGTTCATTTCTAGCCCGTGACCCAACATAAAGTGCATGTCATGCCTTTA	566
	543	CACGATGGATTAGTTCATTTCTAGCCCGTGACCCAACATAAAGTGCATGTCATGCCTTTA	602
	543	CACGATGGATTAGTTCATTTCTAGCCCGTGACCCAACATAAAGTGCATGTCATGCCTTTA	602
	541	CACGATGGATTAGTTCATTTCTAGCCCGTGACCCAACATAAAGTGCATGTCATGCCTTTA	600
	541	CACGATGGATTAGTTCATTTCTAGCCCGTGACCCAACATAAAGTGCATGTCATGCCTTTA	600
	567	GTGGTTTTTATTTTTT-GGGGTATGCTTCCACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCGACGC	625
	603	GTGGTTTT-ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC	661
	603	GTGGTTTT-ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC	661
	601	GTGGTTTT--ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC	658
	601	GTGGTTTT--ATTTTTTGGGGGATGCAGGGACTCACCATTGGCCGTGAGAGGCCCTCGTTCC	658
	626	AGTCAATTCAATTGTAGCTGGACTT-TAGGTCAATATTTCTTTACTCGCATATACATCCAA	684
	662	ATTCAACTCAATTGTAGCTGGACTTATTAGTCAATATTTCTCGTCTCGCATA-AC-TACTA	719
	662	ATTCAACTCAATTGTAGCTGGACTTATTAGTCAATATTTCTCGTCTCGCATA-AC-TACTA	719
	659	ATTCAACTCAATTGTAGCTGGACTTATTGGTCAATATTTCTCGCTTTACATA--C-TACTA	715
	659	ATTCAACTCAATTGTAGCTGGACTTATTGGTCAATATTTCTCGCTTTACATA--C-TACTA	715
	685	GGTGTTTATAATA----TTCATGCTTGATGGACATATTAATTTTTTAATTCACAATTTA-A	739
	720	TCTGC-CATAGTCGGGCTTAATGCTCGATAGACAAAAAAGAATTTAAACAGAAATTCCA	778
	720	TCTGC-CATAGTCGGGCTTAATGCTCGATAGACAAAAAAGAATTTAAACAGAAATTCCA	778
	716	TCTGC-CATAGTCGGGCTTAATGCTCGATAGACAAAAAAGAATTTAAACAGAAATTCCA	774
	716	TCTGC-CATAGTCGGGCTTAATGCTCGATAGACAAAAAAGAATTTAAACAGAAATTCCA	774
	740	CAAGAGCTTCCAACCTCTCTT-CAAGTCCT-----AATTAATTTAAAT-AGAA-CTTT-C	790
	777	CAGTAGATTCAAATACAAAAACAAACGCTCAATCAATTTATTTTTTTTCCGAATCTATAC	838
	777	CAGTAGATTCAAATACAAAAACAAACGCTCAATCAATTTATTTTTTTT-CGAATCTATAC	837
	775	CAGTAGATTCAAACGCAAAAAACAAACGTTCAATCAATTTATTTTTTTT--AGAACCATAT	832
	775	CAGTAGATTCAAACGCAAAAAACAAACGTTCAATCAATTTATTTTTTTT--AGAACCATAT	832

791 - TTTCTTTCTTACTGCTTCAAATTTATTTAACTCTCTCATCAGTA-- -TG-TC-TGCATG 844
839 - TTTATTTAT - -TTGCTTAAAATTTTATTAACCTTGTTCCCCAGTAGTTTGAT-ATTTATT 894
838 - TTTATTTAT - -TTGCTTAAAATTTTATTAACCTTGTTCCCCAGTAGTTTGAT-ATTTATT 893
833 ATTTATTTAT - -CTGATTAAAATTTTATTAACCTTCTTCCCCAGTAGTTTTAACATTCCATA 890
833 ATTTATTTAT - -CTGATTAAAATTTTATTAACCTTCTTCCCCAGTAGTTTTAACATTCCATA 890

845 AATGAGCTATAAAAACGCCATTCTTA-ATACTAATTA-- -TTTACTTACCAATTC-CTTAT 899
895 AAATAACCCTAATTAAACTAAATTACA-ATAGATGATCATCATACTACTACTACACTAAT 953
894 AAATAACCCTAATTAAACTAAATTACA-ATAGATGATCATCATACTACTACTACTACACTAAT 952
891 AAATAGCTCTAATTAATCCAAGCTATATACAGATAACCATTATATTATCACTACACCAAT 950
891 AAATAGCTCTAATTAATCCAAGCTATATACAGATAACCATTATATTATCACTACACCAAT 950

900 GCTCCA-AGAAATTAAT - - -TTTAC - - -TTAACATCCCAACAT - -CCAATAATACTTACA 950
954 AATACTTACATATTACTCTGTTTACCAATCCCATATAAGCATAACCTATAAAAACCTCTA 1013
953 AATACTTACATATTACTCTGTTTACCAATCCCATATAAGCATAACCTATAAAAACCTCTA 1012
951 AATACTTACATATAACTCTGTTTACCAATCCTATATAAGCATGACCCATAAAAATCCCTA 1010
951 AATACTTACATATAACTCTGTTTACCAATCCTATATAAGCATGACCCATAAAAATCCCTA 1010

951 -TATTACTT-TACCCCTTAAACCCCATATAAGTATAACATTATTTAATTTACAA 1002
1014 -CGTTGTTAATGTAGCTTAACCAA-ATA-AAGCAAAGCACTGAAAATGCTAGAT 1064
1013 -CGTTGTTAATGTAGCTTAACCAA-ATA-AAGCAAAGCACTGAAAATGCTAGAT 1063
1011 ACATTGTTAATGTAGCTTAATCCA-ACA-AAGCAAAGCACTGAAAATGCTTAGA 1062
1011 ACATTGTTAATGTAGCTTAATCCA-ACA-AAGCAAAGCACTGAAAATGCTTAGA 1062