



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA
DEL CONEJO ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*)
EN EL PARQUE NACIONAL IZTACCÍHUATL-
POPOCATÉPETL.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:
IRIS JHOSELIN RUIZ MUÑOZ

CODIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRÍQUEZ
DRA. LESLIE MARIELLA MONTES CARRETO



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Contenido

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Variabilidad y estructura genética	4
1.2 Factores que moldean la variabilidad y la estructura genética	5
1.3 Marcadores moleculares microsatélites.....	6
1.4 Importancia de la variabilidad y estructura genética en la conservación	7
1.5 <i>Romerolagus diazi</i>	7
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivo general.....	11
4.2 Objetivos específicos.....	11
5. HIPÓTESIS	11
6. METODOLOGÍA	12
6.1 Área de estudio	12
6.2 Colecta de muestras	12
6.3 Extracción de ADN.....	14
6.4 Amplificación de microsatélites.	14
6.5 Genotipificación	16
6.6 Análisis de datos.....	16
7. RESULTADOS	18
7.1. Extracción de ADN y amplificación de microsatélites por PCR	18
7.2 Análisis genético	18
8. DISCUSIÓN	24
9. CONCLUSIONES	27
10. REFERENCIAS	28

RESUMEN

A lo largo del tiempo, diversas actividades antropogénicas y eventos naturales han tenido como consecuencia la fragmentación y pérdida del hábitat del conejo zacatuche y por ende cambios en la variabilidad y estructuración genética de la especie. Se estudiaron tres poblaciones del conejo zacatuche en el parque nacional Iztaccíhuatl - Popocatepetl, se seleccionó un método no invasivo para obtener ADN a través de excretas, considerando que la especie está en peligro de extinción. Las excretas fueron colectadas en tres áreas: Izta-Popo, Telapón-Tláloc, y Papayo. Se utilizaron cinco loci microsatélites diseñados para la especie, los productos amplificados fueron genotipados y fueron analizados con diferentes métodos estadísticos para alcanzar los objetivos. Se genotipificaron 106 muestras en total. Se observaron niveles bajos de variación genética y de heterocigosidad observada y esperada ($H_E= 0.37$, $H_O= 0.19$) y un índice de fijación bajo ($F_{ST}= 0.019$). La mayor variación genética se encontró dentro de las poblaciones (97%). Se encontró una marcada estructura genética, lo que sugiere que los sitios de muestreo del zacatuche probablemente representan tres grupos genéticos definidos ($K= 3$) a pesar de que todas las poblaciones han experimentado flujo génico. Finalmente, se infirió que las poblaciones han pasado por cuellos de botella en el pasado reciente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Variabilidad y estructura genética

La variabilidad genética se define como la variación del material genético (alelos y genotipos) presentes dentro y entre poblaciones o grupo de especies (Frankham *et al.*, 2002). Se origina principalmente por eventos de mutación, y los mecanismos como flujo génico, deriva génica y selección natural; determinan la distribución y la frecuencia de la variación. Niveles altos de variabilidad genética pueden aumentar el potencial de adaptación de las poblaciones para responder ante los cambios ambientales y así mantener el éxito reproductivo de los individuos. La endogamia, en muchas ocasiones es causada por el tamaño pequeño y aislamiento de la población, esto lleva directamente a una reducción de la variabilidad genética teniendo como consecuencia una depresión por endogamia y por ende la reducción de las probabilidades de persistencia de las poblaciones (Freeland, 2005). Se ha documentado que la mayoría de las especies catalogadas en peligro de extinción tienen valores de variabilidad genética más bajos que las especies que no lo están (Frankham *et al.*, 2002).

La variabilidad genética, se puede estimar mediante marcadores moleculares a través de distintos estimadores, siendo los más utilizados, el número medio de alelos por locus (riqueza alélica: A_r), la proporción de loci variable en una población (polimorfismo: P), la frecuencia media de individuos heterocigotos (individuos con pares de alelos distintos) que se esperaría bajo equilibrio de Hardy-Weinberg (heterocigosidad esperada: H_E) y la proporción de individuos heterocigotos calculados a partir de los genotipos observados en una muestra (heterocigosidad observada; H_O) (Sosa *et al.*, 2002).

Por otro lado, debido a que la diversidad total de una especie consta de componentes intra e inter poblacionales, es importante analizar cómo se distribuye y se estructura la variabilidad genética global, dentro y entre distintas poblaciones (Sosa *et al.*, 2002). De esta manera, podemos cuantificar y determinar el grado de diferenciación genética y la distribución de esta variación a nivel inter poblacional.

La estructura genética hace referencia a la distribución diferencial de frecuencias alélicas entre subpoblaciones de una especie, y puede ser el resultado de la interacción entre factores ambientales, historias de vida, procesos demográficos históricos (ej. deriva génica, tasa de

mutación) y deterministas (ej. selección natural; Freeland, 2005; Hartl y Clark, 1997). Otro factor que interviene en la estructuración genética de las poblaciones es el aislamiento por distancia, ya que a menudo la capacidad de dispersión es menor que la distancia geográfica que hay entre las poblaciones separadas. El análisis de la estructura genética tiene como reto la estimación del flujo génico entre poblaciones. El flujo genético se define como cualquier movimiento de genes de una población a otra (Aguirre, 2007); es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin, 1993).

1.2 Factores que moldean la variabilidad y la estructura genética

La variabilidad y estructura genética son el resultado de procesos históricos y ecológicos. Desde lo histórico, una de las interrogantes más relevantes en biología evolutiva es cómo el origen de la diversidad es regulado por procesos abióticos ocurridos en el pasado (Avice, 2004), tomando en cuenta aquí a los cambios climáticos y orogénicos, que han influido en la fragmentación del hábitat y cambios en los patrones de distribución de las especies (Avice, 2000). Los ciclos de avances glaciales pleistocénicos constituyen uno de los procesos geológicos más radicales que han afectado la distribución y diversidad de la biota actual (Rodríguez-Serrano 2011). Los efectos de las glaciaciones en los rangos de las especies varían con la latitud y la topografía. Las especies de tierras bajas templadas a latitudes mayores experimentan desplazamientos latitudinales, y las especies montañosas cerca de los trópicos desplazamientos altitudinales, esto afecta directamente su capacidad de dispersión, la tasa reproductiva y la susceptibilidad a la extinción (Hewitt, 2000, 2004). Estos factores modulan las respuestas evolutivas de las glaciaciones, modificando el fenómeno primario que experimentan las especies expuestas al cambio climático abrupto: cambios en su distribución geográfica persistiendo en hábitats favorables durante la glaciación y la posterior recolonización de áreas expuestas por el retroceso glacial. Lo anterior se traduce en una primera etapa de reducción del rango de distribución y posteriormente expansión sobre nuevos hábitats. A consecuencia de ello, es altamente probable que ocurra diversificación intraespecífica (Hewitt, 1999).

La pérdida y la fragmentación del hábitat son considerados como las causas principales de la actual crisis de la pérdida de biodiversidad. Se ha documentado que existe una relación entre valores bajos de diversidad y la fragmentación y pérdida del hábitat. La fragmentación es un proceso de división de un hábitat que va quedando reducido en parches o islas de menor tamaño, los cuales pueden tener poca conectividad dentro de una matriz de hábitats distinto al original (Forman y Gordon, 2012). Esta disposición espacial de los fragmentos del hábitat puede influir sobre la movilidad de las especies entre los parches (Gurrutxaga y Lozano, 2006).

1.3 Marcadores moleculares microsatélites

En los últimos años, los estudios sobre genética han progresado gracias a las técnicas de biología molecular, haciendo posible esclarecer complejas funciones a nivel del gen (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Un marcador molecular se define como un gen, una proteína o un fragmento de ADN o ARN que permite caracterizar o distinguir individuos, poblaciones o especies. Entre los marcadores moleculares que se han utilizado en estudios de genética poblacional destacan los microsatélites, ya que son sensibles para la detección de variación genética. Se trata de secuencias cortas de ADN eucariótico que se repiten en tándem a lo largo de la cadena de ADN (Schlötterer y Pemberton, 1994), presentan una alta tasa de mutación (entre 10^{-3} y 10^{-4}), se heredan de manera codominante, son abundantes, y están esparcidos uniformemente a través del genoma. Además, son variables, porque cada segmento amplificado de tamaño variable representa un alelo diferente del mismo locus (Dermachi, 2009). Con el uso de microsatélites ha sido posible obtener información genética de las poblaciones naturales a través de las frecuencias alélicas y la heterocigosidad de cada población.

Se han propuesto tres diferentes modelos de mutación que pueden describir la evolución de los microsatélites. Uno de ellos es el modelo de mutación por pasos (SMM), en el cual las mutaciones nuevas dependen del estado ancestral. Por ejemplo, un microsatélite mononucleótido de ocho pares de bases, sólo puede dar origen a otro microsatélite de siete pares de bases o bien de nueve pares de bases. El segundo es el denominado de alelos infinitos (IAM), el cual considera a todos los alelos diferentes como nuevas variantes y asume que

puede involucrar más de dos nucleótidos en las mutaciones de inserción/delección. Por último, el modelo denominado mutación de dos fases (TPM) afirma que pueden ocurrir mutaciones por pasos y también mutaciones de mayor magnitud (Vázquez-Lobo y Morales-García, 2014). Se ha documentado que el tamaño de la unidad de repetición es la variante para que un microsatélite se adapte más a un modelo o al otro. Así los microsatélites de repeticiones de 3-5 pb se ajustan al modelo SMM, mientras que los de 1-2 pares de bases siguen el IAM o el TPM (Tautz y Schlötterer, 1994).

1.4 Importancia de la variabilidad y estructura genética en la conservación

En las últimas tres décadas, gracias a los avances en las técnicas moleculares y su aplicación en los estudios genéticos de especies, principalmente en peligro de extinción, se ha logrado determinar con precisión el estado de algunas de ellas, por lo que la genética de la conservación se ha convertido en una disciplina distintiva (Wan *et al.*, 2004) La genética de la conservación hace referencia a una mezcla de varias ciencias, entre ellas: ecología, biología molecular y genética de poblaciones. Se puede definir como el uso de la genética para preservar a las especies como entidades dinámicas capaces de tolerar el cambio ambiental (Wan *et al.*, 2004). El principal objetivo de la genética de la conservación ha sido entender y disminuir los problemas genéticos enfrentados por las poblaciones pequeñas, como el efecto deletéreo de la endogamia y la pérdida de variabilidad genética. Los análisis genéticos también pueden permitir estudiar el efecto de la fragmentación y la estructuración en las poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2007). Entender estos patrones genéticos y el grado de diferencia entre las poblaciones resultan aspectos relevantes para el desarrollo de planes efectivos de conservación y preservación de las especies en peligro (Allendorf y Luikart, 2007).

1.5 *Romerolagus diazi*

Romerolagus diazi también es conocido como conejo de los volcanes, teporingo o conejo zacatuche, pertenece al orden de los lagomorfos, es el lepórido más pequeño de nuestro país y el segundo más pequeño del mundo, solo después del conejo pigmeo (*Brachylagus*

idahoensis), con una longitud de 268-285 mm y un peso de 417 a 535 gr (Cervantes *et al.*, 1990). Sus extremidades son cortas, tiene orejas pequeñas y redondeadas y su cola es tan pequeña que no es visible externamente. Presenta pelaje corto y denso color ocre mezclado con negro en el dorso y en las partes laterales, con la cola del mismo color (Merriam, 1896; Rojas, 1951).

Es una especie gregaria, suele vérselo en grupos de dos a cinco individuos lo que indica una organización social bien definida (Cervantes y Martínez-Vázquez, 1996). Su periodo reproductivo comprende todo el año, aunque se intensifica durante el verano y disminuye en el invierno. Se considera una especie especialista de hábitat, ya que para su supervivencia requiere de la presencia de zacatonales amacollados, ya sea puros o asociados a bosque de pino y de pino-encino (Rizo-Aguilar *et al.*, 2016).

Las poblaciones del conejo zacatuche se encuentran distribuidas en parches: cuatro áreas núcleo, Volcán Pelado, Volcán Tláloc, Volcán Popocatepetl y Volcán Iztaccíhuatl y 12 unidades periféricas, distribuidas a los alrededores de las áreas núcleo (Rizo-Aguilar *et al.*, 2014; Velázquez *et al.*, 1996) En los años 90 del siglo pasado, se estimó un tamaño poblacional de aproximadamente 6,683 individuos distribuidos de la siguiente manera: 1,811 en el Volcán Pelado, 1,816 en el Volcán Tláloc, y aproximadamente 3,056 individuos en áreas periféricas (Velázquez *et al.*, 1996).

Una pieza clave en la mayoría de las cadenas tróficas de los ecosistemas mexicanos son los lepóridos (entre ellos, el conejo zacatuche), quien a la par con los roedores, representan el alimento de muchos de los depredadores terrestres (Gómez-Nísino, 2006). El zacatuche se alimenta de las partes verdes y tiernas de herbáceas, pastos, zacatones, y su dieta incluye más de 70 especies de plantas (Mancinez-Arellano, 2017). Con esto interviene en la regulación de la densidad poblacional de la vegetación y, al mismo tiempo, se encarga de la dispersión de semillas por medio de sus excretas (Rodríguez-Franco, 2002). Así mismo, sus excretas dispersan esporas de hongos formadores de micorrizas y levaduras que estimulan el crecimiento de otros hongos y bacterias fijadoras de nitrógeno, y favorecen el crecimiento vegetal. Cuando las esporas llegan a su madurez, atraen a diversos animales entre ellos, el zacatuche, y así se repite el ciclo sucesivamente (Granados *et al.*, 2004).

La causa principal de la disminución de las poblaciones del conejo zacatuche es la destrucción o modificación de su hábitat, principalmente por las actividades antropogénicas. Debido a esto, el estado de conservación de la especie es en peligro de extinción, en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Velázquez y Guerrero, 2019) y en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

2. ANTECEDENTES

Diversos aspectos de la biología del conejo zacatuche han sido abordados a lo largo del tiempo. Pese a su estado de conservación, existen pocos datos acerca de la variabilidad y estructura genética de sus poblaciones. Cervantes *et al.*, (2002) estudiaron la variación genética de poblaciones de algunos lagomorfos mexicanos, entre ellos, cinco individuos del conejo zacatuche. En este trabajo se utilizaron aloenzimas y se reportó un número promedio de 1.5 alelos por locus, un 38.7% de loci polimórficos y un valor de heterocigosis observada de 0.012. Se encontró un alelo fijo y era exclusivo de los individuos del conejo zacatuche.

Soto *et al.*, (2005) compararon la variabilidad genética de *Romerolagus diazi* de dos poblaciones, una silvestre y una en cautiverio utilizando RAPDs como marcador molecular. Se encontró y se evaluó un total de 31 loci, y se observó diferenciación genética en 8. La población silvestre presentó mayor variabilidad genética que la de cautiverio, y seis loci se han perdido en la población de cautiverio. De manera general la variación genética entre las dos poblaciones fue de 46% pero el 54% se encontró dentro de las poblaciones.

Ramírez-Silva, (2009) estudió la diversidad genética de poblaciones silvestres mediante el análisis de 27 secuencias de ADN de la región control mitocondrial de 24 individuos de la Sierra Chichinautzin, un individuo del volcán Popocatepetl y dos individuos de la población en cautiverio del zoológico de Chapultepec. Doce haplotipos diferentes fueron registrados y se encontraron diferencias entre las poblaciones del Ajusco y Chichinautzin, las cuales se encuentran separadas por la carretera México - Cuernavaca.

Osuna *et al.*, (2020) desarrollaron un estudio de variación genética en *Romerolagus diazi* mediante un método no invasivo, con secuencias parciales de dos regiones mitocondriales (Citocromo b y D-loop). A partir del análisis de 152 individuos provenientes de 45

localidades distribuidas a lo largo de la Sierra Chichinautzin y Sierra Nevada, se estimaron la diversidad haplotípica (0.93) y las diferencias nucleotídicas (0.0155). Para todas las poblaciones fueron altas, y en comparación con otros lagomorfos que no se encuentran en peligro de extinción. El AMOVA reveló niveles significativos de estructura genética entre poblaciones y regiones (FCT=0.49 y FCT=0.48 respectivamente). Los valores de diversidad genética fueron altos comparados con el de otras especies. Sin embargo, por parte de los autores se sugieren estudios adicionales con marcadores nucleares para la generación de información más completa que permita determinar cuál es el estado genético actual de esta especie.

Por último, (Montes-Carreto *et al.*, 2020) realizaron el estudio de los efectos de la conectividad del hábitat en la variabilidad genética de *Romerolagus diazi* en seis sitios de muestreo de la Sierra Ajusco - Chichinautzin (Coajomulco, Chalchihuites, Pelado I, Pelado II, Tlálóc I y Tlálóc II). A través de un método no invasivo analizaron muestras de 142 individuos usando 10 microsátélites. Se obtuvieron niveles moderados de heterocigosidad para los distintos parches. La localidad con mayor valor de heterocigosidad fue Tlaloc II ($H_O = 0,71$) mientras que Coajomulco tuvo el valor menor ($H_O = 0,48$). Se estimó un índice de fijación bajo ($F_{ST} = 0.05$) y se obtuvo la mayor variación genética dentro de las poblaciones (94%), y una marcada estructura genética. Además, se evaluó una escala fina y los datos sugirieron que los parches poblacionales representaron dos grupos genéticos definidos ($K = 2$), una conformado por Coajomulco, Chalchihuites y Pelado (I y II) y la otro por Tlálóc I y Tlálóc II.

3. JUSTIFICACIÓN

El conejo zacatuche es una especie monotípica y endémica del Faja Volcánica Trans - mexicana. Es un lagomorfo con características particulares que le confieren importancia desde diferentes perspectivas. Actualmente se encuentra en peligro de extinción por la pérdida de su hábitat por actividades antropogénicas. Estudios previos en la zona de la Sierra de Chichinautzin indican que las poblaciones presentan una variabilidad genética moderada

y diferenciación genética. Por lo tanto, es importante conocer el estado genético actual de las poblaciones del Parque Nacional Iztaccíhuatl – Popocatepetl de las cuales no se tiene información. Para ello se ha seleccionado un método no invasivo a partir de la colecta de excretas, la cuales contienen células epiteliales del tracto digestivo, por lo que es posible la obtención de ADN del individuo. El conocimiento de los atributos genéticos permitirá entender aspectos de su historia evolutiva, ya que se puede inferir el efecto diferencial de las fuerzas micro evolutivas como la mutación, la deriva y el flujo génico. De este modo, además de conocer y entender los procesos que alteran la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones, podría ser la base del desarrollo a futuro de planes de manejo adecuados para conservación y preservación de esta especie endémica del país.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estimar la variabilidad y la estructura genética de conejo zacatuche mediante la extracción de DNA a partir de excretas y el uso de microsatélites.

4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la diversidad genética del conejo zacatuche
- Determinar la estructura genética y el grado de diferenciación
- Estimar si las poblaciones han tenido cambios en su demografía

5. HIPÓTESIS

Debido a que las poblaciones del conejo zacatuche se encuentran distribuidas en parches, se esperaría encontrar alta diversidad dentro de las poblaciones y estructura y diferenciación genética entre ellas, como resultado del efecto de aislamiento por distancia.

6. METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio

El estudio se realizó en el Parque Nacional Iztaccíhuatl - Popocatepetl (Figura 1). Este parque tiene alrededor de 40 mil ha, ubicado en los estados de México, Puebla y Morelos, forma parte de la Sierra Nevada y es una de las áreas naturales protegidas más antiguas de México (SEMARNAT-CONANP, 2013). Los volcanes Popocatepetl e Iztaccíhuatl, constituyen las montañas más altas de la Sierra Nevada. Su vegetación se caracteriza por bosques de coníferas, encinos, y pastizales. El clima que predomina es frío subhúmedo de alta montaña, con temperatura media anual de 5 a 12°C, la del mes más frío de 3 a 8°C y una precipitación media anual de 928 mm (García, 1988).

6.2 Colecta de muestras

Para la colecta de excretas se definieron 3 áreas de muestreo: Popocatepetl-Iztaccíhuatl, Papayo y Telapón-Tlaloc (Figura 1), dentro de cada área se muestreó en sitios diferentes y a través de un método no invasivo se colectaron 106 muestras de excretas las áreas ya referidas. Las excretas frescas de zacatuche son de color ocre, lisas y textura brillante y su diámetro máximo es de un centímetro (Aranda, 2000; Cervantes y González, 1996). Para evitar colectar muestras del mismo conejo, se realizaron recorridos de más de 25 metros entre una letrina y otra dentro en cada sitio de colecta, considerando la distancia del ámbito hogareño determinada a partir de observaciones en campo del conejo zacatuche (Cervantes y Martínez-Vázquez, 1996). Posteriormente, las muestras se colocaron en una hielera para evitar la degradación del ADN y se guardaron en un congelador a -40°C para la futura obtención del ADN.

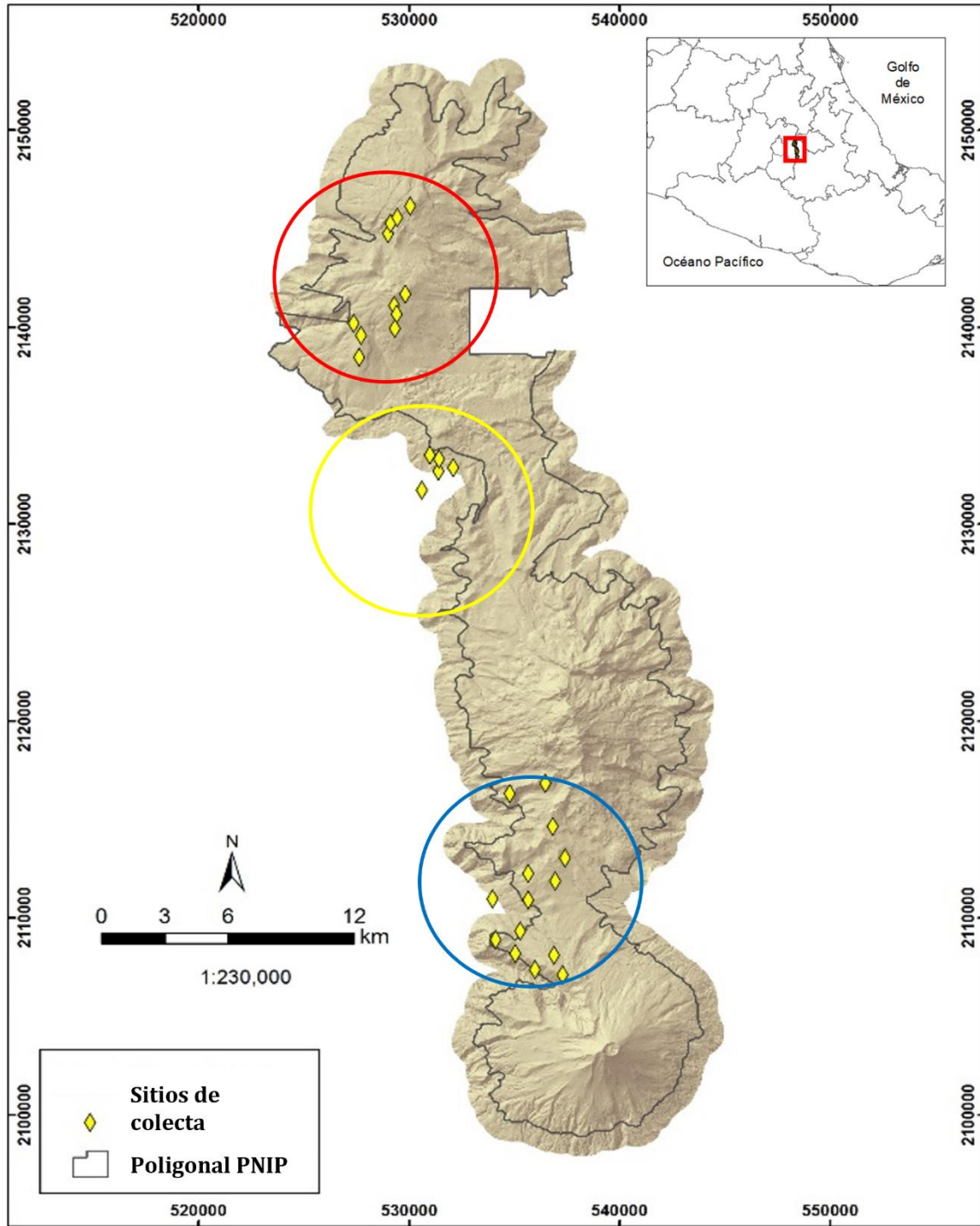


Figura 1. Mapa con los sitios de colecta. El área contorneada de color azul corresponde la población de Iztaccíhuatl-Popocatepetl, el segundo parche poblacional es Telapon-Tláloc que se encuentra marcado con color rojo, por último, marcado en color amarillo el parche poblacional Papayo.

6.3 Extracción de ADN

Para la obtención del ADN genómico, se raspó con un bisturí la superficie de cada excreta (250 mg), donde se encuentran las células epiteliales del tracto del digestivo del conejo zacatuche. La extracción se realizó con el kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la integridad del ADN se midió mediante un NanoDrop™ 2000/2000c y se corrieron geles de agarosa al 1.2 % mediante electroforesis a una velocidad de 90 V durante 45 minutos, teñido con bromuro de etidio (1 µg/ml). Una vez obtenidas las muestras de ADN, se guardaron a -40 °C para evitar la degradación y se utilizaron para las reacciones de PCR.

6.4 Amplificación de microsatélites.

Se amplificaron cinco loci microsatélites que fueron previamente diseñados para el conejo zacatuche (Montes-Carreto *et al.*, 2016) con sus respectivos iniciadores específicos (Tabla 1). Para cada muestra se amplificaron los cinco loci microsatélites obteniendo un total de 530 amplificaciones. Se utilizaron 12.5 µl de GoTaq Green Master Mix 2x (PROMEGA), 8 µl de H₂O, 0.5 µl de cada primer (ida y reverso) y 4 µl de DNA, en un volumen final 25 µl por tubo. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de la mezcla a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos con una fase de desnaturalización a 94°C por 45 s una fase de alineamiento (variable para cada microsatélite; tabla 1) por 45 s y una fase de elongación a 72°C por 45 s, y finalmente un ciclo de elongación final a 72°C por 5 min y un ciclo permanente. Finalmente, los productos de PCR quedaron en fase de conservación a 4°C. Para la visualización de los amplicones se preparó un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (1.5 µg/ml), el cual se corrió mediante electroforesis a 90 V por 45 min y se utilizó un marcador de peso molecular (100pb), para observar los tamaños de los productos amplificados.

Tabla 1. Temperaturas de alineación e iniciadores utilizados para la amplificación de cada loci microsatélite del conejo zacatuche.

Microsatélite	Motivo de repetición	Indicador de ida	Indicador de regreso	T° de alineamiento	Clave de acceso
RoDi 01	AAAG(76)	CAGAAGGATGGGTGCTGACC	GGCCTTGTTTGTCTTCTAATCTCC	62°C	KY873575
RoDi 07	AAAG(27)	TGTCTGTTAAGTCCTTGGCCC	TGATAGAATGGGAGAAATTGTTTGC	58°C	KY873581
RoDi 09	TC(56)	TCCAAATCAGAACAGTCCGC	TCCCTTTCTTCTCCATTCCC	56°C	KY873583
RoDi 10	TC(48)	GGCGATTACAGACATTTGGG	TGTCCTATTAGAAAGACATTACAAACTCC	56°C	KY873584
RoDi 12	AC(40)	GCTGAATGTGTCTTGCTCCG	TCCCAGAAGAAGTACAACCACG	58°C	KY873586

6.5 Genotipificación

El genotipado de las muestras se realizó en el Instituto de Ecología A.C., Xalapa, México. Para la amplificación de los cinco loci microsatélites se utilizó un cebador (de ida) marcado con fluorescencia y el otro sin marcar (de reverso). El análisis se realizó en electroforesis capilar automática (Figura 2, tomada de Rangel-Villabolas, 2010), la cual, mediante un láser, permite estimar el tamaño del fragmento y la presencia de diferentes alelos en un locus. La electroforesis se realizó en el equipo 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems. Los datos fueron analizados con el software GeneMapper versión 4.1 (Applied Biosystems). Los resultados se observaron en un electroferograma de picos correspondientes al tamaño de cada loci microsatélite.

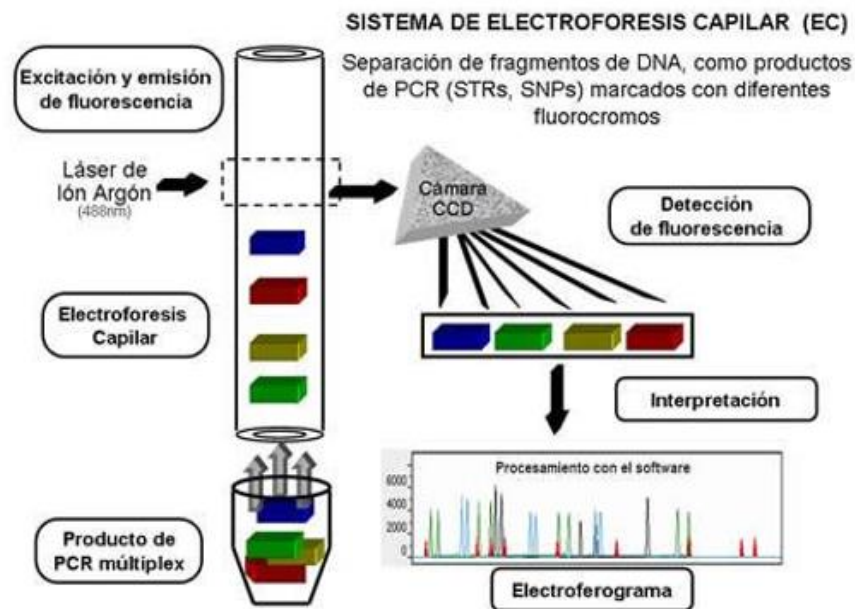


Figura 2. Metodología para el análisis de fragmentos de ADN por electroforesis capilar.

6.6 Análisis de datos

Como herramienta principal se utilizó el programa PGDSpider versión 2.1.1.5 (Lischer y Excoffier, 2012) para poder convertir los diferentes formatos de archivo de los datos generados en el formato requerido para cada programa. La variación genética entre las poblaciones se estimó mediante los siguientes parámetros: heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada y frecuencias alélicas por locus con el programa GENEPOP

versión 4.7 (Raymond y Rousset, 1995). El porcentaje de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos y la prueba exacta del equilibrio de Hardy - Weinberg (H-W) por locus se realizaron mediante el programa Arlequin versión 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005).

La estructura genética se estimó mediante el análisis de variancia molecular AMOVA, considerando los siguientes niveles jerárquicos: entre los parches y dentro de los parches poblacionales, utilizando 10,000 permutaciones con el programa Arlequin.

Se utilizó el programa STRUCTURE versión 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) el cual fue empleado para probar la asignación más probable de los individuos a K poblaciones, empleando método bayesiano implementado en el programa. Los parámetros de análisis fueron 600,000 iteraciones seguido de un burn in de 30,000, una K de uno a cuatro con 25 repeticiones independientes para cada valor de K. Para determinar el número más probable de componentes genéticos (K) en los sitios de estudio se utilizó el método Delta K (valor máximo con menor desviación estándar) (Evanno *et al.*, 2005) implementado en Structure Harvester v.56.3. (Earl y VonHoldt, 2012). (Raymond y Rousset, 1995).

Se estimó la riqueza alélica, el coeficiente de endogamia (F_{IS}) y el índice de fijación (F_{ST}) con 1,000 iteraciones entre las poblaciones con el programa FSTAT versión 2.9.4. (Goudet, 2001), a partir del método de rarefacción que considera el tamaño mínimo de la muestra. Los valores de F_{ST} y el grado de diferenciación genética (Tabla 2) se tomaron de acuerdo con lo propuesto por Wright, (1978).

Tabla 2. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo con Wright (1978).

Valores de F_{ST}	Grados de diferenciación
0 - 0.05	Poca diferenciación genética
0.06 - 0.15	Moderada diferenciación genética
0.16 – 0.25	Alta diferenciación genética
Mayor de 0.25	Alta diferenciación genética

Finalmente, se realizó la prueba M-ratio test presentada por Garza y Williamson, (2001), esta prueba tiene como propósito la detección de cuellos de botella a partir del radio entre el número de alelos y el rango de tamaño de estos según el estadístico $M = k/r$, donde k es el

número de alelos y $r = S_{\max} - S_{\min} + 1$ (siendo S el tamaño de los alelos), lo que permite interpretar M como el porcentaje medio de estados alélicos que están ocupados.

7. RESULTADOS

7.1. Extracción de ADN y amplificación de microsatélites por PCR

Se realizó la extracción y amplificación de ADN de las 106 muestras de excretas colectadas en las tres zonas del Parque Nacional Iztaccíhuatl–Popocatepetl (Telapón-Tláloc n= 40, Popocatepetl-Iztaccíhuatl n=40; Papayo n= 26).

7.2 Análisis genético

Los valores de heterocigosidad observada fueron bajos con respecto a la esperada para las 3 zonas y oscilaron entre 0.16 y 0.24 (Figura 3). La población de Telapón-Tláloc obtuvo el valor mayor ($H_O=0.24$) mientras que la población Izta-Popo presentó el menor valor ($H_O=0.15$).

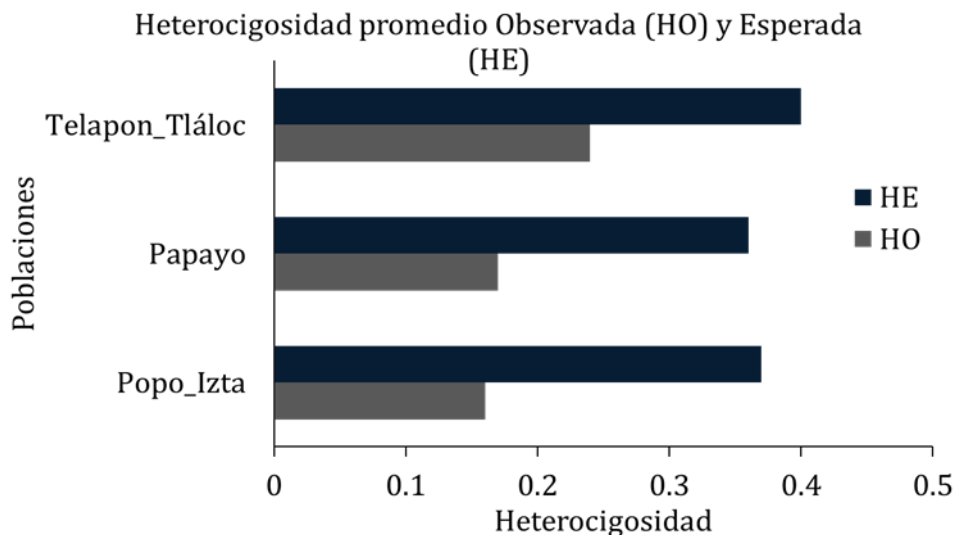


Figura 3. Heterocigosidad observada (H_O) y Esperada (H_E) por sitio de muestreo.

Todos los loci microsatélites fueron polimórficos y estuvieron presentes en las tres poblaciones estudiadas, excepto uno (RoDi 09 en la población Telapón-Tlálloc). Por otra parte, los loci microsatélites menos polimórficos fueron RoDi 01 con dos alelos en las poblaciones Papayo y Telapón-Tlálloc; RoDi 07 con dos alelos en la población Izta-Popo y RoDi 09 con 2 alelos en las poblaciones Izta-Popo y Papayo. El locus RoDi 10 fue el más polimórfico con 11 alelos en la población Izta-Popo. En total se encontraron 60 alelos en las 106 muestras analizadas (Figura 4).

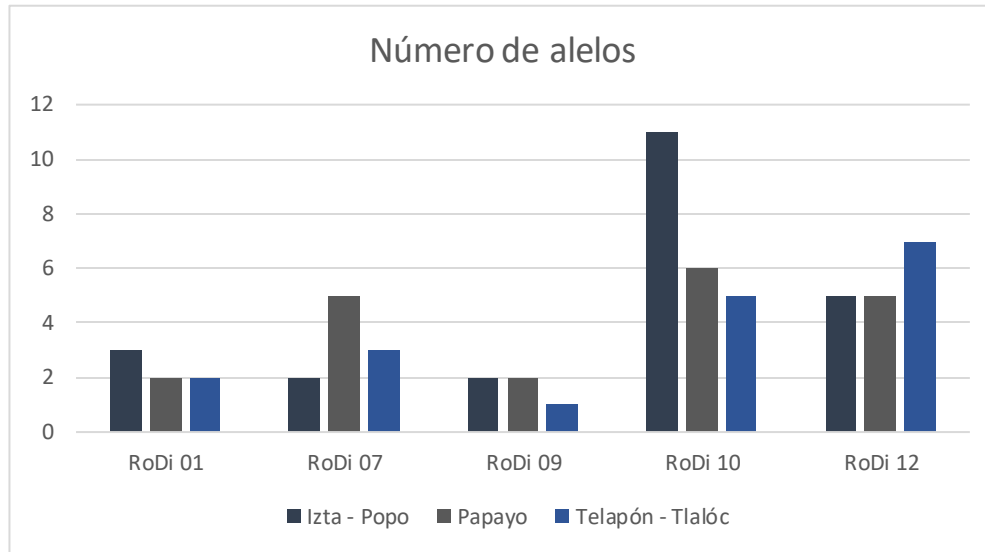


Figura 4. Gráfica de número de alelos por población en cada loci microsatélite.

Los alelos por locus y sus frecuencias alélicas se muestran en la Tabla 3. Los datos que están marcados con color rojo indicaron las frecuencias más bajas: 0.016 para los alelos 96 del locus RoDi01 en la población del Izta-Popo; 86, 88 y 100 del locus RoDi12 de la población de Telapon-Tlálloc, por otra parte, el color azul indica la frecuencia más alta, que es de 1 para el alelo 152 del locus RoDi07 02 de la población Telapon-Tlálloc y para el alelo 98 del locus RoDi10 de la población Izta-Popo (Tabla 3).

Tabla 3. Alelos y frecuencias alélicas de los loci microsatélite del zacatuche.

Población Izta-Popo		
Microsatélite	Alelos	Frecuencia
RoDi09	86	0.056
	90	0.056
	98	1
RoDi10	80	0.114
	84	0.159
	88	0.091
	92	0.045
	96	0.227
	100	0.091
	104	0.091
	108	0.068
	116	0.023
	132	0.045
RoDi07	101	0.034
	152	0.966
RoDi01	96	0.016
	102	0.984
RoDi12	106	0.048
	108	0.048
	110	0.262
	112	0.524
RoDi12	114	0.119
	112	0.656
	114	0.094
	114	0.094

Población Telapón - Tlalóc		
Microsatélite	Alelos	Frecuencia
RoDi09	90	0.1
	98	0.9
RoDi10	80	0.029
	102	0.912
RoDi10	104	0.059
	104	0.059
RoDi07	152	1
RoDi01	80	0.029
	88	0.029
	96	0.382
	100	0.265
RoDi01	108	0.294
	108	0.294
	80	0.031
	86	0.016
RoDi12	88	0.016
	100	0.016
	110	0.172
	112	0.656
RoDi12	114	0.094
	114	0.094

El microsatélite RoDi 01 se encontró en equilibrio de H-W en las poblaciones Papayo y Telapón -Tlálloc al igual que el microsatélite RoDi 07 en la población Izta-Popo (Tabla 4). Es importante destacar que el RoDi 09 para la población de Telapón-Tlálloc fue monomórfico. Esto quiere decir que la variabilidad genética en esta población está disminuyendo y que probablemente este microsatélite ya no se encuentre en esta población.

Tabla 4. Equilibrio Hardy-Weinberg, p-value para cada locus por población, LH = Locus homocigoto.

Microsatélite	Izta-Popo	Papayo	Telapón-Tlálloc
RoDi 01	0.05689	1.00000	1.00000
RoDi 07	1.00000	0.10131	0.03215
RoDi 09	0.01825	0.03725	LH
RoDi 10	0.00000	0.01665	0.00015
RoDi 12	0.00000	0.00000	0.00000

En términos de diversidad genética, el mayor número de alelos y la mayor riqueza alélica se encontraron en la población del Izta – Popo, mientras que los menores valores de estos estimadores se encontraron en la de Telapón -Tlálloc. Sin embargo, la mayor heterocigosidad observada y esperada se encontraron en ésta, por lo tanto, dicha población es la que presentó mayor diversidad genética (Tabla 5).

Tabla 5. Variabilidad de las poblaciones del conejo zacatuche.

Población	Tamaño de muestra	Número de alelos	H_O	H_E	Riqueza alélica
Izta-Popo	40	23	0.16	0.37	2.9
Papayo	26	20	0.17	0.36	2.6
Telapón-Tlálloc	40	17	0.24	0.4	2.2

El análisis molecular de varianza (AMOVA) mostró que la mayor parte de variación genética se encontró dentro de las poblaciones, con un valor superior 99% de la varianza total. Lo que indica que la mayor variación está concentrada entre los individuos dentro de las poblaciones. Por lo tanto, solo el 0.07% fue compartida entre las poblaciones (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de la variación
Entre poblaciones	458.031	0.16294	0.07589
Dentro de poblaciones	23593.462	214.54546	99.92411
Total	24051.494	214.7084	

De acuerdo con las probabilidades obtenidas del análisis de asignación bayesiana, se determinó el número más probable de grupos mediante el método de Evanno arrojando como resultado que existe estructura genética entre las poblaciones del conejo zacatuche (Figura 5), lo cual sugiere que las poblaciones muestreadas del teporingo probablemente representan tres pools genéticos definidos ($K=3$).

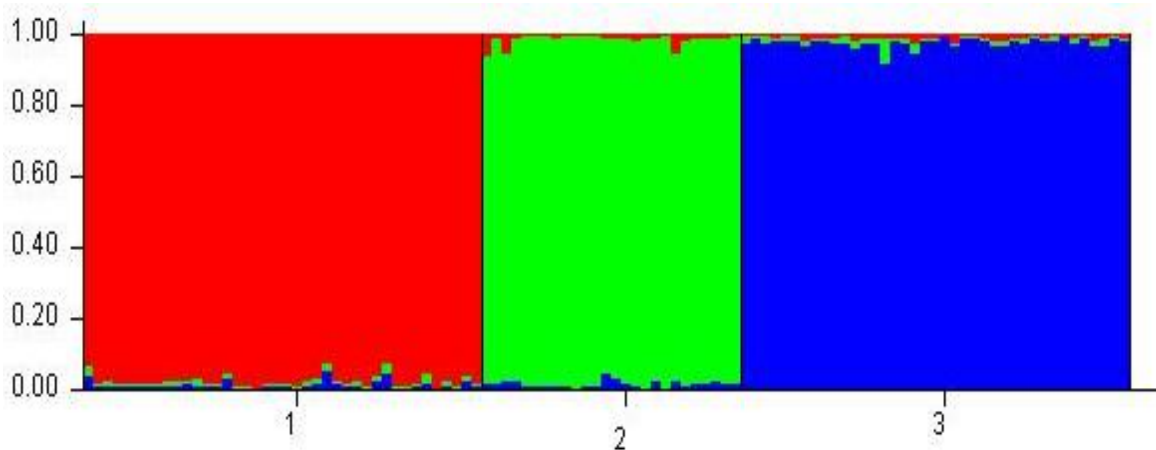


Figura 5. Estructura genética de 3 grupos (definidos por diferente color), donde el rojo (1) es la población del Izta-Popo, el color verde (2) la población de Papayo y el azul (3) la población Telapón-Tlaloc.

El índice de diferenciación de las poblaciones como resultado de la estructura genética fue bajo ($F_{ST}=0.019$). Los valores de F_{ST} entre los parches poblaciones oscilaron entre 0.0071 y 0.0310, de acuerdo con los valores de referencia nos indicaron poca diferenciación genética. (Tabla 7). El coeficiente de endogamia global fue alto ($F_{ST}= 0.506$) de igual forma para todas las poblaciones, el valor más alto se encontró entre la población Papayo e Izta-Popo (0.0310) mientras el menor valor se encontró en las poblaciones Telapón-Tlaloc y Papayo (0.0071) (Tabla 8).

Tabla 7. Valores pareados de F_{ST} de las de las poblaciones del conejo zacatuche.

Valores pareados de F_{ST}			
	Izta-Popo	Papayo	Telapón-Tlálóc
Izta-Popo	0.0000		
Papayo	0.0310	0.0000	
Telapaon-Tlálóc	0.0214	0.0071	0.0000

Tabla 8. Coeficiente de endogamia global por cada población.

Coeficiente de endogamia global	
Izta - Popo	0.585
Papayo	0.535
Telapaon - Tlálóc	0.400

Los valores de M (Tabla 9) fueron calculados por locus para cada población y oscilaron entre 0.03846 y 1, y casi todos fueron más bajos que el valor crítico de 0.68 propuesto por Garza y Williamson (2001), excepto RoDi 09 en la población Telapón-Tlálóc, donde el valor de M fue de 1. Estos valores que indican que las tres poblaciones estudiadas han pasado por un cuello de botella reciente. Esto nos podría indicar que la especie ha sufrido un drástico descenso en el número de miembros de la población.

Tabla 9. Índice de Garza–Williamson para las poblaciones estudiadas.

Microsatélite	Izta-Popo	Papayo	Telapón-Tlálóc
RoDi 01	0.23077	0.13333	0.22222
RoDi 07	0.28571	0.21739	0.12000
RoDi 09	0.03846	0.20000	1.00000
RoDi 10	0.19298	0.2069	0.17241
RoDi 12	0.55556	0.15152	0.20000

8. DISCUSIÓN

De manera general, los valores de variabilidad genética medidos por la heterocigosidad, número de alelos y riqueza alélica encontrados en este estudio en el Parque Nacional Iztaccíhuatl Popocatepetl fueron menores comparados con otras especies de lagomorfos en donde se reportaron valores de variación genética bajos $H_O=0.33$, $A_r= 3.2$ para el conejo *Sylvilagus transitionalis* (Fenderson *et al.*, 2011) y para el conejo *Oryctolagus cuniculus* $H_O=0.24$ (SurrIDGE *et al.*, 1999). De manera particular, la variabilidad genética del zacatuche es baja comparada con otros lagomorfos que también están se encuentran amenazados. Por ejemplo, los niveles de variabilidad genética reportados para el conejo pigmeo *Brachylagus idhaoesis*, endémico de Estados Unidos, son $H_O=0.6$ a 0.7 , $RA=4.3-5.6$ (Estes-Zumpf *et al.*, 2010), y para liebre *Lepus americanus*, son $H_O=0.67$, $RA=13.4$, en un estudio donde concluyeron que, pese a la fragmentación del hábitat, los tamaños poblacionales se han mantenido y también la diferenciación genética (Burton y Burton, 2002)

Así mismo, los niveles de variabilidad genética del zacatuche encontrados en la Sierra Nevada son aproximadamente la mitad de los reportados para la Sierra Chichinautzin ($H_O=0.48-0.71$, $RA=4.2-7.5$) en donde se analizaron 250 muestras. Los valores bajos de variabilidad genética encontrados en las poblaciones de zacatuche de la Sierra Nevada pudieron ser causados por un cuello de botella relacionado con las actividades antropogénicas causado por la destrucción del hábitat, así como también por el aislamiento geográfico a largo plazo. Varios estudios demostraron que el resultado de la pérdida de la conectividad entre las poblaciones y la reducción en el tamaño de éstas conlleva consecuencias negativas tanto genética como demográficamente (Biedrzycka y Konopiński, 2008; Dixo *et al.*, 2009; Klimov *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2008). Esto es un aspecto preocupante pese al estado de conservación en el que se encuentra la especie, ya que la reducción del tamaño poblacional puede llevar a una depresión por endogamia, la cual disminuye el potencial reproductivo y la tasa de sobrevivencia (Frankham *et al.*, 2002).

Otra posible razón de los bajos niveles de variabilidad genética es que estén asociados a que solo se estudiaron 106 muestras y 5 microsatélites. En general, los estudios de genética de la conservación analizan más de 100 muestras por unidad de muestreo. Esto quiere decir que entre mayor sea el tamaño de muestra mayor probabilidad de obtener mayor

representatividad. El tamaño de muestra requerido dependerá de la diferenciación genética entre individuos de la especie en diferentes zonas geográficas (por ejemplo). Además, en algunos estudios se ha llegado a la conclusión que es importante potenciar al máximo el tamaño de la muestra y la cobertura temporal. Los resultados de estudios basados en muestras pequeñas pueden dar falsos positivos (Ely *et al.*, 2002). Debido a ello, se sugiere que se incremente el tamaño de muestra y el número de microsatélites para tener una mejor estimación de la variabilidad genética del zacatuche en esta zona de su distribución. Algunos recomiendan 20-30 microsatélites (Nei y Roychoudhury, 1974).

La variabilidad genética del zacatuche fue distinta en cada población. La población Telapón-Tlálloc presentó la menor riqueza alélica ($A_r = 2.2$) con 17 alelos, pero aquí se observó el mayor valor de heterocigosidad ($H_E = 0.4$), esto nos indica que hay más individuos heterocigotos pero la variación de los alelos es deficiente. El nivel de variabilidad genética de esta población podría considerarse moderado debido al número de individuos analizados. La población Izta-Popo, se encuentra geográficamente a mayor distancia de las otras dos, se encontró que la heterocigosidad observada ($H_E = 0.37$) fue baja, pero no la menor, sin embargo, la riqueza alélica ($A_r = 2.9$) es la más elevada; esto indica que aquí hay una mayor variación genética pero pocos individuos heterocigotos. En la población Papayo no se pudo obtener el mismo tamaño de muestra debido al acceso limitado a la zona, la riqueza alélica (2.6) con 20 alelos fue mayor que Telapón-Tlálloc, la heterocigosidad ($H_E = 0.36$) es la más baja en comparación con las otras dos poblaciones.

Casi todos los loci microsatélites fueron polimórficos excepto por RoDi 09 en la población Telapón-Tlálloc. La presencia de un loci microsatélite homocigoto indicaría que las poblaciones podrían tener un déficit de heterocigotos y por lo tanto estar en equilibrio de H-W (Hartl y Clark, 1997).

Por otra parte, los análisis de AMOVA revelaron que el principal componente de la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas corresponde a la variación dentro de las poblaciones (99%), mientras que una contribución mucho menor corresponde a variación entre poblaciones (0.07%). Esto sugiere que las poblaciones estudiadas tienen poca diferenciación genética y los resultados se reforzaron con los valores bajos pareados de F_{ST} entre las poblaciones, que oscilaron entre 0.0310 y 0.0071. Las poblaciones que presentaron menor diferenciación fueron Telapón-Tlálloc y Papayo, se sugiere que esto puede atribuirse

a dos elementos: 1) que las poblaciones se encuentren dentro de la misma zona de hábitat continuo, y 2) que se encuentren a menor distancia (2 Km). Además, en estas zonas el grado de fragmentación y degradación del hábitat es menor a diferencia de las zonas periféricas (Uriostegui-Velarde, 2013). Por el contrario, las poblaciones que tuvieron la mayor diferenciación fueron Papayo e Izta-Popo; si bien es sabido, son dos poblaciones con la mayor distancia geográfica (30 km aproximadamente), actualmente están separados por la autopista México-Puebla fungiendo como una barrera antropogénica. El proceso de urbanización conlleva varias situaciones que deterioran el hábitat. La creación de caminos, la apertura de centros de recreación y la acumulación de desechos en el área de distribución del zacatuche se han documentado también como amenazas reales para la especie (Velázquez-Montes, 1996).

El análisis de K poblaciones reveló que las poblaciones estudiadas representan tres pozas genéticas definidas, a pesar de los resultados ($F_{ST}= 0.019$) donde se revela la baja estructuración genética. Esto es evidencia de que sí ha existido flujo génico entre las poblaciones a pesar de la distancia a la que se encuentran, la existencia de barreras naturales y antropogénicas podrían haber limitado el intercambio genético entre las poblaciones.

Los análisis genéticos mostraron que las tres poblaciones de zacatuche estudiadas en el Parque Nacional Izta-Popo han pasado por un cuello de botella, ya que se encontraron diferencias significativas en los valores de M. Estos resultados coinciden con lo reportado por Montes-Carreto *et al.*, (2020) donde a través de un método de distribución de frecuencias alélicas demostraron que las poblaciones de la Sierra Chichinautzin habían disminuido su tamaño poblacional y habían experimentado un cuello de botella. Cuando ocurre una disminución en el tamaño poblacional se produce una disminución del número de alelos y de la heterocigosidad. Generalmente, la diversidad alélica se reduce más rápidamente que la heterocigosidad ya que se suelen perder primero los alelos raros, que contribuyen poco a la heterocigosidad, y como consecuencia hay un exceso de heterocigotos con respecto a lo esperado en una población bajo el equilibrio mutación-deriva (Williamson-Natesan, 2005).

La pérdida de zacatonales a causa de las actividades antropogénicas es la principal amenaza para conservación del zacatuche (AMCELA *et al.*, 2008). Esto ha ocasionado una reducción en las áreas de distribución de las poblaciones del zacatuche (Hoth *et al.*, 2009; Velázquez *et al.*, 1996) y en la pérdida de conectividad estructural entre ellas (Uriostegui-Velarde, 2013).

Pese a esta situación, los datos genéticos generados en este estudio muestran que aún no ha pasado tiempo suficiente para que las poblaciones se diferencien genéticamente y que a pesar de que los valores de variabilidad genética son bajos, la conectividad estructural está presente, lo cual es importante para mantener e incluso incrementar la viabilidad genética de las poblaciones, específicamente en especies en peligro y de esta manera crear un mejor plan de manejo y conservación de la nuestra especie de estudio.

9. CONCLUSIONES

Los microsatélites diseñados específicamente para el zacatuche permitieron recuperar información genética de algunas poblaciones de su distribución tanto de zonas núcleo como de zonas periféricas.

Se encontró un valor de variabilidad genética bajo ($H_O=0.16-0.24$, $RA=2.2-2.9$) para las poblaciones ya mencionadas del zacatuche.

Los valores de endogamia (F_{IS}) fueron altos para todas las poblaciones. Aunque se identificaron 3 pozas, los F_{ST} fueron bajos y hay flujo génico entre ellos, aunque se prevé la pérdida total del mismo ya que los niveles son muy bajos.

Las poblaciones analizadas han pasado por un cuello de botella, ya que se encontraron diferencias significativas en los valores de M .

10. REFERENCIAS

- Aguirre, E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. In Eguiarte L E, Souza V, Aguirre X, eds. Ecología Molecular. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio) Instituto de Ecología, UNAM Ciudad de México, México. 11-51 pp.
- Allendorf, F. W., y Luikart, G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Oxford, UK: Blackwell. 587 pp.
- AMCELA, Asociación Mexicana para la Conservación y Estudio de los Lagomorfos, Romero-Malpica, F. J., Rangel-Cordero, H., De Grammont, P. C., y Cuarón, A. D. 2008. *Romerolagus diazi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008.
- Aranda, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México. 212 pp.
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., y Jordana, J. 2005. Los microsatélites STR's, marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: Una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 13, 1-6.
- Awise, J. C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Awise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.
- Biedrzycka, A., y Konopiński, M. K. 2008. Genetic variability and the effect of habitat fragmentation in spotted suslik *Spermophilus suslicus* populations from two different regions. Conservation Genetics, 9: 1211-1221.
- Burton, P. J., y Burton, C. M. 2002. Promoting genetic diversity in the production of large quantities of native plant seed. Ecological Restoration, 20, 117-123.
- Cervantes, F. A. y González, F. X. 1996. Los conejos y las liebres silvestres de México. In: Velázquez, A., Romero, F. J. y J. López (Eds.) Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. UNAM y Fondo de Cultura Económica. 204 pp
- Cervantes, F. A., Lorenzo, C., y Hoffmann, R. S. 1990. *Romerolagus diazi*. Mammalian

- Species, 1, 360 pp.
- Cervantes, F. A., Lorenzo, C., y Yates, T. L. 2002. Genetic variation in population of mexican lagomorphs. *Journal of Mammalogy*, 83: 1077-1086.
- Cervantes, F. A., y Martínez-Vázquez, J. 1996. Historia natural del conejo zacatuche o teporingo *Romerolagus diazi*. *Journal of Mammalogy*, 83, 1077-1086 pp.
- Dermachi, D. A. 2009. Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 11: 73-88.
- Dixo, M., Metzgera, J. P., Morganteb, J. S., y Zamudioc, K. R. 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*, 142: 1560-1569.
- Earl, D. A., y VonHoldt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., y Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). Instituto de Ecología, UNAM. Ciudad de México, México 608 pp.
- Ely, B., Stoner, D. S., Alvarado, J. R. B., Dean, J. M., Addis, P., Cau, A., Thelen, E. J., Jones, W. J., Black, D. E., Smith, L., Scott, K., Naseri, I., y Quattro, J. M. 2002. Analyses of Nuclear IdhA Gene and mtDNA Control Region Sequences of Atlantic Northern Bluefin Tuna Populations. *Marine Biotechnology*, 4: 583-588.
- Estes-Zumpf, W. A., Rachlow, J. L., Waits, L. P., y Warheit, K. I. 2010. Dispersal, gene flow, and population genetic structure in the pygmy rabbit *Brachylagus idahoensis*. *Journal of Mammalogy*, 91: 208-219.
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Fenderson, L. E., Kovach, A. I., Litvaitis, J. A., y Litvaitis, M. K. 2011. Population genetic structure and history of fragmented remnant populations of the New England cottontail

- Sylvilagus transitionalis*. Conservation Genetics, 12: 943-958.
- Forman, R. T. T., y Gordon, M. 2012. Components ecology landscape structural. Bioscience, 31: 733-740.
- Frankham, R., D. Ballou, J., y Briscoe, D. A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, New York. 644 pp.
- Freeland, J. R. 2005. Molecular Ecology. Southern Gate, Chichester, West Sussex. 384 pp.
- Garza, J. C., y Williamson, E. G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. Molecular Ecology. 10: 305-318.
- Gómez-Nísino, A. 2006. Ficha técnica de *Vampyrum spectrum*. Los Mamíferos Mexicanos En Riesgo de Extinción Según El PROY-NOM-059-ECOL-2000.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, A program to estimate and test gene diversity and fixation indices. versión 2.9.4.
- Granados, D., López, G. F., Hernández, M. Á., y Sánchez-González, A. 2004. Ecología de la fauna silvestre de la Sierra Nevada y la Sierra del Ajusco. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente, 10: 111-117.
- Gurrutxaga, M., y Lozano, J. 2006. Efectos de la fragmentación de hábitats y pérdida de conectividad ecológica dentro de la dinámica territorial. Departamento de Geografía, Prehistoria y Arqueología. Universidad Del País Vasco, 16: 35-54.
- Hartl, D. L., y Clark, A. G. 1997. Principles of population genetics. Oxford University Press. 542 pp.
- Hewitt, G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. Biological Journal of the Linnean Society, Molecular genetics in animal ecology, 68: 87-112.
- Hewitt, G. M. 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages. Nature, 405: 907-913.
- Hewitt, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 359: 183-195.
- Hoth, J., Velázquez, A., León, L., Aranda, M., y Bell, D. J. 2009. The volcano rabbit: a shrinking distribution and a threatened habitat. Oryx, 21: 85-91.
- Klimov, A., Munguia-Vega, A., Hoffman, J. I., y Culver, M. 2014. Genetic diversity and demography of two endangered captive pronghorn subspecies from the Sonoran Desert. Journal of Mammalogy, 956: 1263-1277.
- Lischer, H. E., y Excoffier, L. 2012. PGDSpider: an automated data conversion tool for

- connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28: 298-299.
- Mancinez-Arellano, A. 2017. Dieta del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) en hábitats contrastantes del corredor biológico Chichinautzin. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en biología, UAEM. Cuernavaca, Morelos.
- Merriam, C. H. 1896. *Romerolagus nelsoni*, a new genus and species of rabbit from Mt. Popocatepetl, Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 10: 169-174.
- Montes-Carreto, L. M., Guerrero, J. A., Rizo-Aguilar, A., Moreno-Santillán, D. D., y Ortega, J. 2016. Development of microsatellite loci for the endangered Volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) by using Illumina paired-end sequences. *Conservation Genetics Resources*. 8: 359-370.
- Montes-Carreto, L. M., Guerrero, J. A., y Ortega, J. 2020. Effects of Habitat Fragmentation on the Genetic Variability of the Volcano Rabbit (*Romerolagus diazi*). In: Ortega J, Maldonado J, eds. *Conservation Genetics in Mammals*, Ciudad de México, México. 197-215 pp.
- Nei, M. y Roychoudhury, A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379–390.
- Osuna, F., González, D., Espinosa de los Monteros, A., y Guerrero, J. A. 2020. Phylogeography of the Volcano Rabbit *Romerolagus diazi*: the Evolutionary History of a Mountain Specialist Molded by the Climatic-Volcanism Interaction in the Central Mexican Highlands. *Journal of Mammalian Evolution*, 27, 745-757.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Ramírez-Silva, J. P. 2009. Diversidad genética entre las poblaciones del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*). Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM. Distrito Federal, México. 68 pp.
- Rangel-Villabolas, H. 2010. La prueba de paternidad con ADN. *NOTICONAQUIC*, 18: 40-51.
- Raymond, M., y Rousset, F. 1995. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Rizo-Aguilar, A., Delfín-Alfonso, C., González-Romero, A., y Guerrero, J. A. 2016.

- Distribution and density of the zacatuche rabbit *Romerolagus diazi* at the Protected Natural Area “Corredor Biológico Chichinautzin.” *Therya*, 7: 333-342.
- Rizo-Aguilar, A., Guerrero, J. A., Hidalgo-Mihart, M. G., y González-Romero, A. 2014. Relationship between the abundance of the Endangered volcano rabbit *Romerolagus diazi* and vegetation structure in the Sierra Chichinautzin Mountain range, Mexico. *Oryx*, 492: 360-365.
- Rodríguez-Franco, C. 2002. Forests in the Basin of Mexico: types, geographic distribution, and condition. In: Fenn, M E, de Bauer L I, Hernández-Tejeda, T, eds. *Urban Air Pollution and Forests. Ecological Studies*. 68-85 pp.
- Rodríguez-Serrano, E. 2011. Consecuencias de las glaciaciones pleistocénicas sobre la diversidad genética de *Abrothrix olivaceus* waterhouse Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae. *Mastozoología Neotropical*, 18: 319-330.
- Rojas, M. P. 1951. Estudio biológico del conejo de los volcanes (*Romerolagus*) (Mammalia: Lagomorpha). Tesis. UNAM, Ciudad de México, México.
- Schlötterer, C., y Pemberton, J. 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a critical review. In: DeSalle, R., Schierwater, B, eds. *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhäuser, Basel, 71-86 pp.
- SEMARNAT-CONANP. 2013. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Volcán Tacaná. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 190 pp.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de La Federación*, 1-70 pp.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47, 264-279.
- Sosa P. A., González-Pérez M. A., Batista F., Bouza N. 2002. Conservación genética de especies vegetales amenazadas. In: Bañares-Baudet A, ed. *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid, Spain. 133–160 pp.

- Soto, S., Contreras, V. M., Matzumura, J. L., Vásquez, P. D., y Peláez, C. G. 2005. Estimación de la variabilidad genética en el teporingo. *Veterinaria México*, 36: 119-133.
- SurrIDGE, A. K., Bell, D. J., Kamal, I. M., y Hewitt, G. 1999. Population structure and genetic variation of European wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in East Anglia. *Heredity*, 82: 479-487.
- Tautz, D., y Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Gevelopment*, 4: 832-837.
- Uriostegui-Velarde, J. M. 2013. Conectividad de las poblaciones del zacatuche (*Romerolagus diazi*) en la sierra del Chichinautzin. Tesis de Maestría. Maestría en biología integrativa de la biodiversidad y conservación, UAEM. Cuernavaca, Morelos. 70 pp.
- Vázquez-Lobo A., y A. E. Morales-García. 2014. Microsatélites. Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. 256pp.
- Velázquez-Montes, J. A. 1996. Taller internacional para la conservación de los conejos y liebres mexicanos en peligro de extinción. Asociación Mexicana para la Conservación y Estudio de los Lagomorfos. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J006. México D. F.
- Velázquez, A., y Guerrero, J. A. 2019. *Romerolagus diazi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019.
- Velázquez, A., Romero, F. J., y López-Paniagua, J. 1996. Ecología y conservación del conejo zacatuche *Romerolagus diazi* y su hábitat. Fondo de Cultura Económica y Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 204 pp.
- Walker, F. M., Sunnucks, P., y Taylor, A. C. 2008. Evidence for habitat fragmentation altering within-population processes in wombats. *Molecular Ecology*, 17: 1674-1684.
- Wan, Q., Wu, H., Fujihara, T., y Fang, S. 2004. Rhich genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25: 2165-2176.
- Williamson-Natesan, E. G. 2005. Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 6: 551-562.
- Wright, F. 1978. Evolution and genetics of populations. Variability within and among Natural Populations., University of Chicago Press. Chicago. 580pp.

Cuernavaca, Morelos a 3 de mayo de 2022.

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **IRIS JHOSELIN RUIZ MUÑOZ**, con el título del trabajo: **VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL CONEJO ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*) EN EL PARQUE NACIONAL IZTACCÍHUATL-POPOCATÉPETL.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el voto aprobatorio para que pueda optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. ROSA CERROS TLATILPA

SECRETARIO: DRA. ALEJANDRA VAZQUEZ LOBO YURÉN

VOCAL: DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRIQUEZ

SUPLENTE: DRA. ELIZABETH ARELLANO ARENAS

SUPLENTE: DRA. ARELI RIZO AGUILAR



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ROSA CERROS TLATILPA | Fecha:2022-05-10 19:55:32 | Firmante

AmIbBHtK0v8fOHQaWo0gbBOaYB0Z9QzETwknPAEpzPfn4xvChAJWeekByjdmzhOzrGIQ2zPu65CWm8+rgzF3VcPmBFdDOSFIUCYsa7VczBJg+ykMMPU2xSzbCU8adJWsN5AD2MFdIIdfCLrrIKCQnk7BZoeRI84wAcXaE8/ye15y3zG+WFH5nXLjuRmp/H251250o98OEm1yNqUjsOVbm4X64E3SqfE2VzUwUmMJ4SPWrGwKAp3RPcea4iOpXBPjdXsrrResOnIwndiYGH858Tm5hdvzwL221sqSmgK7M8FvPGFjZ8xIs6XXzp/vycvsAlf2ZqVALKVxYjsrw==

JOSE ANTONIO GUERRERO ENRIQUEZ | Fecha:2022-05-12 19:42:17 | Firmante

jnMfkivWNyy8xchUF+T+o+2JVNAhph+zRNRxVUdo8Mv/ri3mATeii8iD3xL6TveMkKlz+h+mShclfqesinHiofgTRGF4n/GjIH6B7CDVWJhhkCl1xMisY0j+DWX5uEh9gAjqLaoTXxzYyfCHNxytus5Ca0bCiM7UxdPZO4o3TJZ8spqPycPlqOcDh3d/8YU6oNDMwJlxMYVgUVaJ20OfSjzo1xYGOeDMH5PNI3CL306ebpVnR3FvYyaNoHRwf9Yctwsxlvdq9ta/hX4UNXDF0rRdQ1ffog2Sj6eBVZpiV2WZQ6keM9safihaw7fp0l21GCkTrb0eC9l28TfLQ==

ALEJANDRA VAZQUEZ LOBO YUREN | Fecha:2022-05-16 21:40:27 | Firmante

fXYiH4X1/4KpVUWb0JGuevdD/K9GNxiFGTQXS6LNH5XjBwHPpMxP3DUgBhTsBYgkQyWV5pBKxiUODZEbuFp0hOUEjkapMjWF8oRpmc1DSIWkdImbjntXRF0NILsoVVand0QALZTz6+hhmTvDKNFW6mPbUhc1P0F4lbd2vhF9ZX2pavAXV5u5qoktg1ghYtne74+9oRVG7nUAeX7wt3B1yUfZqqb5wYXZ7n/emBC6QgAOBRn8TMPa0FDMqdaJwW71eYwwYWh90TVd0EKN9g0BaCkL6Tafyf7AMGgYSA7mPgAcM3dNSmJtYP/5PBqVW9cFiqK0rJD1VodBz0wd5KVhSg==

ARELI RIZO AGUILAR | Fecha:2022-06-01 14:13:36 | Firmante

W97xYeVP9f4SvHs9rNi5C7OuQGzypgfHAsu8HHwxg/8crsJZibGiYpGJaDXJeTGFclWTPHY045pjgvyNSZNPof3WVrc5VWv5Liu63ZZIO4eViCnW2KeXYV3F0syrLDjNfckFxS3c1aNa1R0HvyzEhIYITDgT6GMDWyNYoKS8be7Vgiqpale+3mzRIOVQyl9mBj9zPZRmpNOTwSUvk5SV6fEMhWDV63Pg9PHJZ5C3K3Z/oS77sMTHjU4a4SozXIP7GJicOclwgiBc4GSln2RN+6QgjiYvUq8oLbn/sVS75esWDVD2xMGviZVvbkRNXYBZ/OuweXqPb9TzvgA==

ELIZABETH ARELLANO ARENAS | Fecha:2022-06-06 19:02:17 | Firmante

b1uslgopPLAn9clLiE23UlpDKUE2nochKu/3q2ZRaoRCA3FSr/CkmbB65MrWgSqCLTaJAXrpPqDFVR8IK39hh7JPD6FO1v/ED5tuVhacS+y3BMph7EObMDWxYfH0PuvnMJMWFCON2Y7zEwntYhVpV9vBZdBLM9iQWB5CUP7F++9+qIYkiB+OkeV37LiHP5F1VogrmysHsFWg6PLE4g2fpwXXvURd3F3F7Zhs1jRvxxE8Wrc6TFliw/W7dNhhjRGjif1BC+6AfAHadZYFTWp13cWc+YTeuJqKTeve/qpGERcV8Syqu24+dY50iV8laBOe5x9zHz5xh5j6Bfof9A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0ii5X2gGP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Sm03oVsJ3IsBbaoXNqkEw52EzEZ8fLDI>

