

NUEVOS REGISTROS DE LA ARDILLA DE PETERS *SCIURUS OCULATUS* (PETERS 1863), PARA MICHOACÁN Y PRIMERA GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE

TIBERIO C. MONTERRUBIO-RICO,^{1*} DANIEL GUIDO-LEMUS,¹ JUAN
FELIPE CHARRE-MEDELLÍN,¹ MARÍA GUADALUPE ZAVALA-PARAMO,²
GABRIELA PADILLA-JACOBO,² HORACIO CANO-CAMACHO,² & LIVIA
LEON-PANIAGUA³

¹Laboratorio de Ecología de Vertebrados Terrestres Prioritarios, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán 58194, México.

²Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán 58194, México.

³Museo de Zoología, Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 70-399, México.

*Correspondencia: <tmonter2002@yahoo.com.mx>, <tiberio@umich.mx>

Monterrubio-Rico, T. C., Guido-Lemus, D., Charre-Medellín, J. F., Zavala-Paramo, M. G., Padilla-Jacobo, G., Cano-Camacho, H. & Leon-Paniagua, L. 2013. Nuevos registros de la ardilla de Peters *Sciurus oculatus* (Peters 1863) para Michoacán y primera genotipificación molecular de la especie. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*, 29(2): 304-316.

RESUMEN. Capturamos tres ejemplares de la ardilla de Peters (*Sciurus oculatus*), especie listada en protección especial y endémica del centro de México. Las capturas ocurrieron en fragmentos de bosque de encino del municipio de Huandacareo, Michoacán. Con el registro de esta población se confirma la presencia actual de la especie en el estado, ya que su último registro es de 1986 de un ejemplar colectado en Contepec. La localidad de Huandacareo extiende la distribución conocida de la especie hacia el oeste en 48 km aproximadamente con respecto a su registro más reciente. Al revisar los pocos registros de la especie para el estado, se observó que el registro más occidental de la especie, el de Ziracuaretiro (cerca de Uruapan), no se incluyó en la delimitación de su distribución, por lo que el mapa de distribución conocida debe actualizarse incluyendo todas las localidades, lo que modificaría de forma importante su distribución. Revisando la base de datos de GeneBank, notamos la inexistencia de secuencias de ADN mitocondrial de *S. oculatus*. En este estudio presentamos las dos primeras secuencias del gen de citocromo b (*cytb*) provenientes de dos individuos de *S. oculatus*. Las secuencias fueron comparadas en análisis filogenético con ocho especies del género *Sciurus* disponibles en GeneBank. En el análisis de las secuencias y árbol de UPGMA que incluyó especies de Norteamérica y de Sudamérica, *S. oculatus* se agrupó con *S. aestuans* y *S. stramineus* de Sudamérica, siendo *S. oculatus* la especie basal. Es importante que en el futuro se investigue con mayor detalle la relación de la especie en el género *Sciurus*. Desde la

Recibido: 08/03/2012; aceptado: 23/04/2013.

perspectiva de conservación debe evaluarse su distribución actual en el país. Actualmente se desconoce cuántas poblaciones existen en áreas protegidas de México. La población registrada en Huandacareo parece estar aislada y su hábitat rodeado de agricultura.

Palabras clave: Sciuridae, distribución, endémica Mexicana, citocromo b.

Monterrue-Rico, T. C., Guido-Lemus, D., Charre-Medellín, J. F., Zavala-Paramo, M. G., Padilla-Jacobo, G., Cano-Camacho, H. & Leon-Paniagua, L. 2013. New records of Peters squirrel *Sciurus oculatus* (Peters 1863) for Michoacán and first molecular genotyping of the species. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*, 29(2): 304-316.

ABSTRACT. We captured three individuals of Peter's squirrel (*Sciurus oculatus*), species listed under special protection and endemic for central Mexico. The captures occurred on oak forest fragments from Huandacareo municipality, Michoacán. With the record of this population, we confirm the species actual presence for the state, because the last record corresponded to a specimen collected in Contepec in 1986. This locality extends the species known distribution to the west approximately in 48 km from its last known record. When we reviewed the species historical records for the state, we notice that the western-most record of the species, a record from Ziracuaretiro (near to Uruapan), was not included to outline the species global distribution, therefore we consider that the present distributional map should be updated including all the localities, which will modify its distribution considerably. After surveying the GeneBank international database, we noticed that mitochondrial DNA sequences from *S. oculatus* were inexistent. In this work we presented the first two cytochrome b gene (*cytb*) sequences from two *S. oculatus* individuals. The sequences were compared with eight species of the *Sciurus* genus available in GeneBank. In the sequences analysis and UPGMA tree, which included *Sciurus* species from North America and South America, *S. oculatus* was clustered with *S. aestuans* and *S. stramineus* from South America, resulting *S. oculatus* the basal species. From the conservation perspective, the species actual presence in the historical localities should be verified. No protected areas in the country are known to include *Sciurus oculatus* populations, and the Huandacareo recorded population seems to be relatively isolated, and its habitat surrounded by agriculture.

Key words: Sciuridae, distribution, Mexican endemic, cytochrome b.

INTRODUCCIÓN

La ardilla de Peters (*Sciurus oculatus*) es una especie arbórea de tamaño relativamente grande (530-560 mm de largo total), ligeramente menor en talla que *Sciurus aureogaster* (418-773 mm de largo total), pero más robusta ya que alcanza hasta 750 gramos de peso y de hábitos diurnos (Best 1995). Es una especie endémica del centro de México que se distribuye en el este y centro del Eje Neovolcánico Transversal y porciones de la Sierra Madre Oriental (Hall 1981, Best 1995, Valdez-Alarcón & Téllez-Girón 2005). Existen tres subespecies reconocidas, *S. oculatus oculatus* que se distribuye al este desde Querétaro a Hidalgo y Veracruz. *S. oculatus shawi* que se distribuye en San Luis Potosí, y *S. oculatus tolucae* que ocurre en suroeste de Querétaro, Guanajuato, el estado de México y el oeste de Michoacán. El color del pelaje presenta ligera variación entre las subespecies; pero en general la región dorsal es grisácea, y hacia la base se torna de oscura a negra. La región ventral varía de color blanco hasta amarillo ocráceo pálido. Presenta un anillo ocular blanco o crema bien diferenciado

(Valdez-Alarcón & Téllez-Girón 2005). El vientre es más claro y notablemente diferente al de *S. aureogaster*, especie con la que coincide ampliamente en su distribución a nivel regional (Best 1995). Además de la coloración, su principal diferencia con *S. aureogaster* es el menor número de dientes, ya que carece de los segundos premolares. La fórmula dentaria de *S. oculatus* es I 1/1, C 0/0, PM 1/1, M 3/3 (Ceballos & Galindo 1984, Hall 1988, Best 1995). Se les observa con facilidad en el verano, y en los meses fríos es difícil encontrarlas. Son herbívoras y se alimentan principalmente de bellotas, conos de pinos, capulines, frutas de higo, yemas, cortezas, y polen de los oyameles (Best 1995, Valdez-Alarcón & Téllez-Girón 2005). Habita en bosques de pinos, encinos y abies, por sus hábitos arborícolas requieren del estrato arbóreo de estas asociaciones vegetales (Ceballos & Galindo 1984, Best 1995). Se distribuye en áreas con altitudes entre 1500 y 3600 msnm (Hall 1988, Best 1995).

La información disponible sobre la ardilla de Peters para Michoacán, y en general para México es escasa, desconociéndose aspectos sobre la especie como reproducción, ecología poblacional, y hasta ahora de la genética de la especie (Best 1995). Se consultaron diferentes bases de datos sobre mamíferos de Michoacán tanto en colecciones de México como de Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (Álvarez & López 1998, López-Wilchis 2003). Para Michoacán se reportan históricamente cuatro ejemplares colectados provenientes de tres localidades. El primer registro corresponde a un ejemplar macho colectado el 12 de agosto de 1970 en el rancho “La cofradía”, 4 millas al este de Uruapan, pero al georeferenciar ese localidad corresponde al municipio de Ziracuaretiro. Dos registros más correspondieron a dos hembras colectadas el 14 de agosto de 1970 en Puerto Murillos, 37 millas al este de Querendaro, la localidad corresponde al municipio de Tlalpujahua. Los tres ejemplares registrados se encuentran depositados en el laboratorio Moore de Zoología en Occidental College, en Los Angeles California (López-Wilchis 2003). La tercer y última localidad histórica de registro para la especie en el estado es del 17 de abril de 1986, de la localidad de Epitacio Huerta y está depositado en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (Álvarez & López 1998).

Hasta hace poco la presencia actual de la ardilla de Peters (*S. oculatus*) en el estado de Michoacán podía considerarse incierta. Existían en bases de datos tres localidades con registros, los registros de dos localidades son de hace 40 años y el registro más reciente de hace 26 años. Además, los hábitats de la especie (bosques templados) en las localidades históricas en el eje Neovolcánico Transversal (Epitacio Huerta, Tlalpujahua), y en el municipio de Uruapan, han sido severamente reducidos y fragmentados debido a la expansión de ganadería, huertas de aguacate, agricultura y tala inmoderada, siendo Michoacán un estado que presenta elevadas tasas de pérdida de bosques (Mas-Caussel *et al.* 2005). Afectada por la caza ilegal, y por pérdida de bosques, la ardilla de Peters ha sido considerada desde hace tiempo como una especie vulnerable (Leopold 1959, Best 1995). Actualmente se encuentra listada bajo protec-

ción especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Valdez-Alarcón & Téllez-Girón 2005, SEMARNAT 2010). En este reporte, presentamos evidencia que confirma (dos ejemplares depositados, registros fotográficos, y secuencias de ADN) la presencia actual de *S. oculatus* en el estado de Michoacán provenientes de una nueva localidad que modifica de manera importante su distribución conocida en el occidente (Fig. 1).

MATERIALES Y MÉTODOS

El municipio de Huandacareo se ubica en el extremo norte del estado de Michoacán ($19^{\circ}59'24''\text{N}$, $101^{\circ}16'32''\text{W}$, 1,840 m.), limita al norte con el estado de Guanajuato y al oriente con Cuitzeo, al sur con los municipios de Chucándiro y Copándaro, y al oeste con Villa Morelos (Secretaría de Educación del Estado de Michoacán 2003). El clima es templado con lluvias en verano (Cw) y una precipitación pluvial anual de 965 mm y temperaturas que oscilan los 12.4° a 27.2°C , los principales tipos de vegetación que se presentan en la zona son; el matorral subtropical, y el bosque de encino. Como parte de un diagnóstico sobre la situación actual de la fauna en la Cuenca del lago de Cuitzeo, se efectuaron muestreos e inventarios en campo durante el periodo marzo de 2010 a abril de 2011 en el que incluyó transectos diurnos y nocturnos, trampas toma-

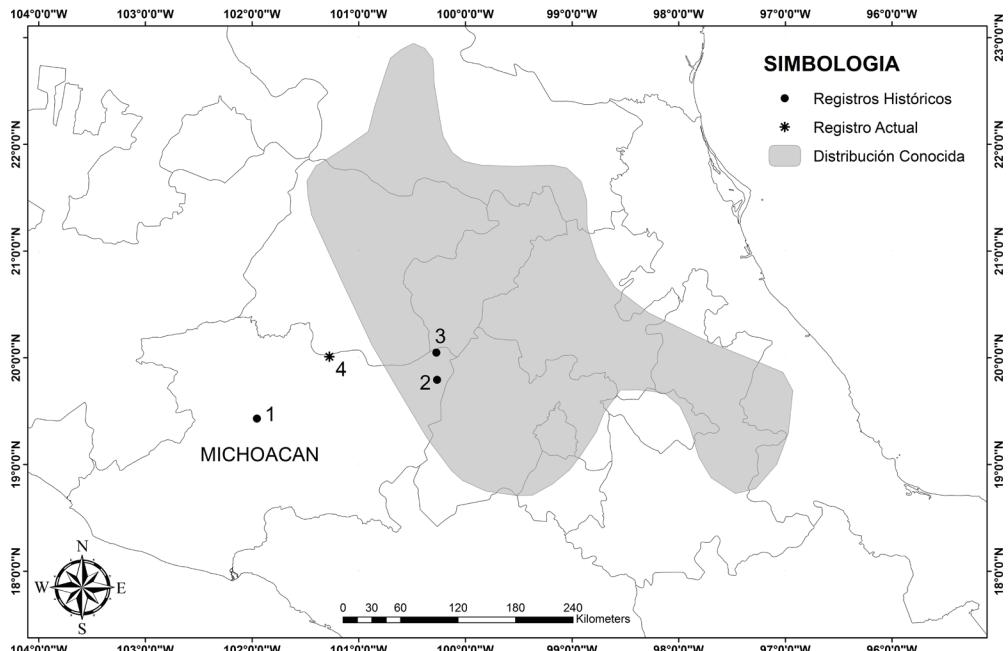


Figura 1. Localidades de registro de *S. oculatus* en Michoacan. 1) Ziracuaretiro. 2) Tlalpujahuá. 3) Contepec. 4) Huandacareo. Con relación al mapa de distribución de Patterson *et al.* 2007.

hawk y Sherman, y trampas cámara para los mamíferos terrestres. A los ejemplares capturados se les midió largo total, cola vertebral, pata trasera, oreja en mm, y peso en gramos. Adicionalmente se obtuvo registros fotográficos en su hábitat (Fig. 2).

A partir de los ejemplares colectados se tomaron muestras de piel de 2 cm, y a partir de un ejemplar capturado y liberado posteriormente se colectó de 100 µl de sangre puncionando una oreja con una jeringa para insulina de 0.5 mm. Las muestras de piel y sangre se colocaron en viales de 2 ml con 0.5 ml de buffer de conservación y lisis (Tris 100 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 10 mM y SDS 2%) (Dutton 1996), se conservaron a temperatura ambiente durante su traslado y posteriormente se almacenaron a 4 °C. Las muestras fueron depositadas en la colección de muestras biológicas de fauna silvestre del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

La genotipificación molecular se realizó a partir de las muestras de piel registradas con la clave Scoc2 y Scoc3 y de sangre registrada con la clave Scoc1. El ADN genómico se extrajo mediante el método libre de fenol de FitzSimmons (1997). Para



Figura 2. Ejemplar de *S. oculatus* en su hábitat de Huandacareo posterior a su liberación.

la amplificación por PCR del gen citocromo bde ADN mitocondrial (*cytb*), se utilizó el juego de oligonucleótidos L14724 (5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCA-TCGTTG-3') y H15915 (5'-GGAATTCATCTCTCCGGTTACAAGAC-3'), para la obtención de un fragmento de aproximadamente 1200 pb (Irwin *et al.* 1991). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ l como sigue; Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 200 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleótido, PlatinumTaq polimerasa 1.5 U (Invitrogen) y 50 ng de ADN. Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (Gene Amp 2700, AppliedBiosystems) bajo las siguientes condiciones; desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 93°C por 1 min., alineamiento a 50 °C por 1 min, polimerización a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min. La secuenciación de ambas cadenas del ADN se realizó por el método de di-deoxy (Sanger *et al.* 1977), mediante el sistema comercial DNA Sequencing (BigDye v3.1Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Applied Biosystems), en un secuenciador automático (ABI PRISM 310 Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para el análisis de las secuencias de ADN obtenidas, se comparó con la base de datos internacional BLAST GeneBank (NCBI) y para obtener los porcentajes promedio de los nucleótidos en las secuencias se usó MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011).

Para validar a los ejemplares colectados en el género *Sciurus*, y examinar de forma preliminar las relaciones filogenéticas de *S. oculatus* dentro del género *Sciurus*, se comparó el gen de citocromo b (*cytb*) de las secuencias obtenidas de dos de los ejemplares (Scoc3 y Scoc1) en este estudio, con secuencias de las siguientes especies del género reportadas en GeneBank (NCBI): *S. aberti*, *S. lis*, *S. niger*, *S. stramineus*, *S. aestuans*, *S. carolinensis*, *S. anomalus* y *S. vulgaris*, utilizando como grupos externos a *Tamiasciurus hudsonicus grahamensis* (Tribu Tamiasciurini), considerada como grupo cercano y emparentado con el género *Sciurus* (Mercer & Roth 2003), y *Aplodontia rufa*, único representante de la Familia Aplodontiidae, también considerado como grupo hermano de la Familia Sciuridae de acuerdo a Carleton y Musser (2005) (Cuadro 1).

Se alinearon 1040 pb de 11 secuencias de *cytb*, mediante el programa BioEdit (Hall 1999) y se aplicaron tres métodos de inferencia de árboles filogenéticos. Agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA), máxima parsimonia (MP), y máxima verosimilitud (ML). Para construir el árbol UPGMA se utilizó el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011) y los árboles MP y ML se realizaron en el programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002), con 1000 réplicas y un bootstrap de 200 réplicas en el árbol de MP. El árbol ML se construyó bajo el modelo de evolución molecular GTR+I+G determinado como el mejor modelo para los datos bajo el criterio de información Akaike (AIC) con el programa ModelTest 3.7 (Posada & Crandall 1998).

Cuadro 1. Secuencias de nucleótidos de *cytb* reportadas para el género *Sciurus*, usadas en el análisis filogenético.

ESPECIE	ABREVIATURA	NO. ACCESO GENBANK
<i>Sciurus stramineus</i>	<i>S. stramineus</i>	gi 281309707 dbj AB292678.1
<i>Sciurus aestuans</i>	<i>S. aestuans</i>	gi 18077373 emb AJ389530.1
<i>Sciurus carolinensis</i>	<i>S. carolinensis</i>	gi 225593550 gb FJ200744.1
<i>Sciurus niger</i>	<i>S. niger</i>	gi 225593552 gb FJ200745.1
<i>Sciurus aberti</i>	<i>S. aberti</i>	gi 1478111 gb U10176.1
<i>Sciurus anomalus</i>	<i>S. anomalus</i>	gi 281309703 dbj AB292676.1
<i>Sciurus vulgaris</i>	<i>S. vulgaris</i>	gi 281309709 dbj AB292679.1
<i>Sciurus lis</i>	<i>S. lis</i>	gi 62318385 dbj AB192892.1
<i>Tamiasciurus hudsonicus grahamensis</i>	<i>T. hudsonicus</i>	gi 284944549 gb GU175443.1
<i>Aplodontia rufa</i>	<i>A. rufa</i>	gi 18072979 emb AJ389528.1

RESULTADOS

El 19 de Junio del 2010 durante un transecto diurno en el sitio conocido como el Encinal, municipio de Huandacareo ($20^{\circ}03'6.0''N$, $101^{\circ}16'28.8''W$) a 1,946 msnm, con la ayuda de un cazador local se colectó el primer ejemplar de *S. oculatus* en un bosque de encino. El ejemplar es un macho adulto cuyas medidas generales en mm fueron: LT= 255, CV= 334.8, PT= 60, y O= 28, y un peso de 400 grs. (número de catálogo: MZFC-11070). El segundo ejemplar fue colectado el 12 de Septiembre del 2010, un macho adulto que presentó los testículos escrotados, sus medidas generales (mm) fueron: LT= 255, CV= 330, PT= 54, y O= 35, y un peso de 535 grs. (número de catálogo: MZFC-11071). Este segundo ejemplar se colectó en un bosque ripario en el sitio conocido como Arroyo del Pueblo (N $20^{\circ}0'30.1''$, W $101^{\circ}16'1.7''$) a 1958 msnm. Los dos ejemplares presentaron un pelaje grisáceo con manchones blancos en la parte dorsal, un anillo ocular de color blanco alrededor de los ojos, una cola larga, y detrás de sus orejas presentan un manchón de color blanco. A los dos ejemplares se les tomó muestra de piel para el análisis de ADN. Ambos especímenes se depositaron en la colección de mamíferos del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Un tercer ejemplar fue capturado mediante trampa tomahawk el 12 de febrero de 2011 en un bosque de encino en la localidad de “El Encinal” (N $20^{\circ}0'30''$, W $101^{\circ}16'1.7''$), un macho con los testículos escrotados. A este ejemplar se le tomó muestra de sangre para el análisis de ADN, y se le liberó en el sitio después de medirlo y pesarlo. Su medidas generales fueron LT= 240, CV= 230, PT= 54, y O= 22, y un peso de 575 grs.

Se obtuvo dos secuencias parciales de 1091 y 1090 pb, la primera correspondiente a Scoc1 y la segunda correspondiente a Scoc3 (número de catálogo: MZFC-11071),

sin embargo, no se logró la obtención de la secuencia de Scoc2 (número de catálogo: MZFC-11070). La comparación de las dos secuencias obtenidas en banco de datos internacional BLAST GeneBank (NCBI) mostró una similitud en un rango de 88 a 84 % con el gen de citocromo b de especies del género *Sciurus* (Cuadro 2). Ambas secuencias fueron depositadas en GeneBank (Números de acceso: JQ627638 y KC261417) y se encontró que previo a este estudio, no existen secuencias de ADN mitocondrial reportadas para *S. oculatus*. El análisis de alineamiento entre las secuencias *cytb* de los dos individuos Scoc1 y Scoc3 mostró la presencia de dos haplotipos (líneas maternas).

El análisis de alineamiento de las 11 secuencias para observar las posibles relaciones filogenéticas mostró los siguientes porcentajes de cada nucleótido: T=33.6%, C=27.2%, A=25.7% y G=13.5%. En el árbol de UPGMA (Fig. 3) se pueden identificar claramente dos clados monofiléticos divergentes (en lo sucesivo CI y CII), CI está integrado por especies del nuevo mundo (*S. oculatus*, *S. aberti*, *S. stramineus*, *S. niger*, *S. carolinensis* y *S. aestuans*) y CII que incluye especies representantes del viejo mundo (*S. anomalus*, *S. vulgaris* y *S. lis*), cuya topología es similar a la reportada por Oshida *et al.* (2009). Bajo este método se forma un subclado (CIa) que agrupa a las especies: *S. oculatus*, *S. aestuans* y *S. stramineus*, y en este subgrupo *S. oculatus* es basal; además se presentan *S. niger* y *S. carolinensis* como especies hermanas (Subclado CIb) y *S. aberti* como la OTU (Unidad taxonómica operacional) (Martínez 2007) basal de las ardillas americanas.

En los árboles de ML y MP (Figs. 4 y 5, respectivamente) se corrobora la monofilia de las especies americanas aquí analizadas, aunque en MP el valor bootstrap es de 76 el grupo CI se soporta también en árboles construidos bajo los métodos “Neighbor-Joining y Mínima evolución” (árboles no mostrados). En el árbol ML al igual que en UPGMA, se observa la misma relación de *S. oculatus* con las especies Sudamericanas *S. stramineus* (endémica de Ecuador y Perú) y *S. aestuans* (Argentina, Brasil, Venezuela y Guayana), las cuales son más cercanas a *S. oculatus* que las especies del

Cuadro 2. Porcentajes de identidad entre *cytb* de *S. oculatus* y las secuencias correspondientes de especies del género *Sciurus*.

Especie	Identidad
<i>Sciurus stramineus</i>	88%
<i>Sciurus aestuans</i>	88%
<i>Sciurus carolinensis</i>	86%
<i>Sciurus niger</i>	86%
<i>Sciurus aberti</i>	86%
<i>Sciurus anomalus</i>	84%
<i>Sciurus vulgaris</i>	84%
<i>Sciurus lis</i>	84%

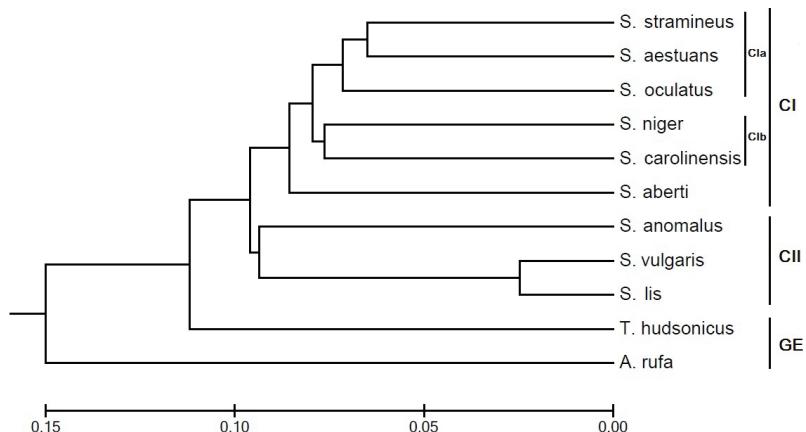


Figura 3. Árbol UPGMA inferido a partir de secuencias de *cytb* del género *Sciurus*. *A. rufa* (*Aplodontia rufa*) y *T. hudsonicus* (*Tamiasciurus hudsonicus grahamensis*) como grupos externos (GE), se muestran dos clados CI (integrado por especies del nuevo mundo) y CII (donde se agrupan especies del viejo mundo) y los subclados CIa (que muestra la relación de *S. oculatus* con especies sudamericanas) y CIb.

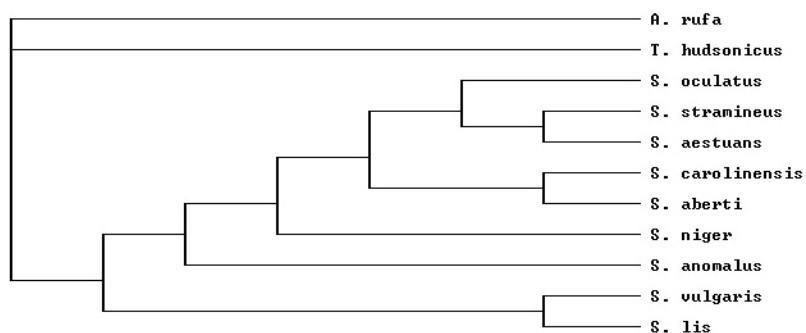


Figura 4. Reconstrucción filogenética con el método de Máxima verosimilitud (ML) inferido a partir de secuencias de *cytb* del género *Sciurus* bajo el modelo evolutivo GTR+I+G. Se observan como grupos externos: *A. rufa* y *T. hudsonicus*. Soporta los clados CI, CII y CIa (ver abreviaturas en el texto).

norte y *S. oculatus* es una OTU basal de las ardillas sudamericanas. Por otro lado, *S. oculatus* presenta una mayor divergencia con las especies Norteamericanas de Canadá y Estados Unidos: *S. aberti*, *S. niger* y *S. carolinensis* (Figs. 3 y 4). En cambio en MP existe una relación como especies hermanas entre *S. oculatus* y *S. aberti*, aunque esta información debe considerarse con cautela (valor bootstrap de 59, Fig. 5). En los tres tipos de análisis se presentan dos grupos como especies hermanas, uno formado por *S. lis* y *S. vulgaris* y otro integrado por *S. stramineus* y *S. aestuans* (en MP tienen un valor bootstrap de 100 y 75 respectivamente).

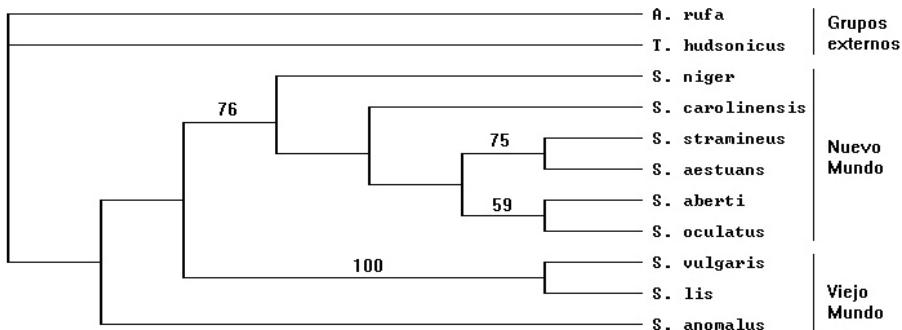


Figura 5. Árbol consenso estricto de Máxima Parsimonia (MP) inferido a partir de secuencias de *cytb* del género *Sciurus*. Se distinguen las especies del grupo externo, el clado monofilético integrado por especies del nuevo mundo (CI) y las especies del viejo mundo (CII). Los números sobre las ramas corresponden a los valores bootstrap.

A diferencia del reporte de Oshida *et al.* (2009) donde *S. anomalus* (especie del viejo mundo) se agrupa con ardillas del nuevo mundo, en todas las construcciones aquí presentadas se observa a *S. anomalus* más cercana a *S. vulgaris* y *S. lis*, además de aparecer como basal de las ardillas americanas en ML (Figs. 3, 4 y 5). De manera similar a lo reportado por de Oshida *et al.* (2009) se soporta la relación de especies hermanas entre *S. vulgaris* y *S. lis* (bootstrap de 100 en MP, Fig. 5).

DISCUSIÓN

La población de *S. oculatus* de Huandacareo parece estar aislada de las otras poblaciones conocidas de la especie, considerando la distancia y la deforestación circundante (Fig. 1). El registro actual y el de Ziracuaretiro modifican la distribución conocida de la especie, por lo que su mapa de distribución conocida debe ser actualizado. La especie en la zona de estudio no parece ser escasa de acuerdo a cazadores locales, sin embargo es necesario hacer un estudio poblacional para conocer la viabilidad de esta población. En esta localidad, la especie presenta un gradiente altitudinal relativamente amplio, desde los 1500 a casi los 2000 m. Existe poca información sobre reproducción de la especie, en la localidad de estudio la actividad reproductiva de la especie podría ser entre los meses de septiembre a febrero, al presentar los dos machos con testículos escrotados. Mientras que se reporta en hembras de Veracruz actividad reproductiva en los meses de julio y agosto (Best 1995). La evidencia además reveló un posible radio sexual cargado hacia los machos, ya que la totalidad de ejemplares capturados fueron machos, aunque este sesgo también pueda deberse a patrones de conducta distintos entre ambos sexos, un aspecto clave que deberá estudiarse a futuro en esta población.

El análisis de comparación de *cytb* de las muestras de los dos individuos secuenciados (Scoc1 y Scoc3) con las bases de datos en GeneBank, mostró la carencia de secuencias para *S. oculatus*, por lo que este par de secuencias del gen *cytb* son las primeras depositadas y disponibles en GeneBank. El análisis filogenético de la secuencia de Scoc3 mediante UPGMA y ML mostró que *S. oculatus* tiene una relación más cercana con las ardillas Sudamericanas *S. stramineus* y *S. aestuans*, y es basal para este subgrupo; presenta mayor divergencia con las especies de ardillas Norteamericanas de Canadá y Estados Unidos, *S. aberti*, *S. niger* y *S. carolinensis*. En las construcciones filogenéticas obtenidas en este trabajo se distinguen topologías similares a las reportadas por Oshida *et al.* (2009), pero además se delimitan y separan perfectamente los dos clados que corresponden a especies del nuevo y del viejo mundo.

Se observó que la posición de algunos OTUs cambia dentro de las topologías de los árboles filogenéticos, esto se debe por un lado a la manera en la que los métodos de construcción de filogenias tratan a los datos, y por otro a la ausencia de otras especies del género. Como es el caso de la relación que existe entre *S. oculatus* en Cl_a en UPGMA y ML y la relación que presenta de especies hermanas con *S. aberti* en MP, tal discrepancia deberá aclararse en posteriores análisis filogenéticos. De cualquier manera, para aclarar estas inconsistencias cuando la intención sea revisar las relaciones filogenéticas dentro del género *Sciurus* será imperativo incluir las 28 especies del género y tomar información de otros marcadores moleculares mitocondriales y nucleares, para determinar y esclarecer la posición de cada especie dentro del árbol filogenético del género.

Desde el punto de vista de conservación, ante el grave escenario de deforestación en el estado y en el centro del país, es urgente confirmar la presencia actual de poblaciones de la especie en todas las localidades históricas. Además debe evaluarse su conectividad o el nivel de aislamiento en el que se encuentren estas poblaciones, ya que todas las localidades de la especie se encuentran en regiones severamente fragmentadas, rodeadas de agricultura, huertos y potreros (Mas-Caussel *et al.* 2005). En la entidad, como en la mayor parte del área de distribución de *S. oculatus*, se desconoce el estado de sus poblaciones y sus requerimientos, e ignoramos si existen poblaciones dentro de áreas protegidas. Por su similar apariencia general en tamaño y coloración a *S. aureogaster*, es posible que en muchas localidades donde se realizan inventarios sin colecta científica, *S. oculatus* y *S. aureogaster* sean confundidas, ya que son similares en tamaño, aunque *S. aureogaster* presenta una coloración de pelaje muy variable. Sumado a que ambas utilizan los mismos hábitats en zonas templadas, y presentan un amplio traslape en sus distribuciones globales (Best 1995). Ante esta situación, y al contar con dos secuencias de *cytb* que corresponden a dos haplotipos de la especie como resultado de este trabajo, recomendamos que en futuros inventarios de fauna, en los casos donde se traslanan las distribuciones de estas especies y se dude de la determinación correcta, se colecten muestras de sangre, sin necesidad de

sacrificar los ejemplares, ya que es posible poder confirmar la identidad mediante una comparación con las secuencias reportadas en GeneBank.

AGRADECIMIENTOS. El presente trabajo es el resultado del gran esfuerzo de campo por parte del personal del Laboratorio de Ecología de Vertebrados Terrestres Prioritarios. Agradecemos al proyecto del Programa de Restauración de la Ribera del Lago de Cuitzeo con Clave.- 116865, financiado por fondos Mixtos CONACYT-Gobierno de Michoacán, y a la Coordinación de investigación Científica de la UMSNH por su continuo apoyo. También un agradecimiento especial para Alberto Fco. Gómez-Tagle-Rojas coordinador del proyecto. Agradecemos a DGVS y SEMARNAT por el permiso de colecta científica (FAUT-0170) a nombre de Livia León Paniagua. Agradecemos al Dr. Joaquín Arroyo por su apoyo en la validación taxonómica, y a la familia Ortiz-Lemus por todas las atenciones prestadas, en especial al Sr. Mario Ortiz-Gonzales por su ayuda en campo, por sus conocimientos y por su tiempo.

LITERATURA CITADA

- Álvarez S. T. & Vidal, J. C. L. 1998. *Biodiversidad de los mamíferos en el Estado de Michoacán*. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Base de datos SNIB2010-CONABIO proyecto No. P020.
- Best, T. L. 1985. *Sciurus oculatus. Mammalian species*, 498:1-3.
- Carleton, M. D. & Musser, G. G. 2005. Order Rodentia, pp. 745-752. In: Wilson, D. E. & Reeder, D. M. (Eds.). *Mammal species of the world*.3a. Ed. Johns Hopkins University Press.
- Ceballos-Gonzales, G. & Galindo- Leal, C. 1984. *Mamíferos Silvestres de la Cuenca de México*. Instituto de Ecología y Museo de Historia Natural de la Ciudad de México. Editorial Limusa. México, D.F. 299 pp.
- Dutton, P. H. 1996. Methods for collection and preservation of simples for sea turtle genetic studies. In: Bowen, B. W. & Witzel, W. N. (Eds.). *Proceedings of International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum, NMFS-SETSC-396 pp.17-24.
- FitzSimmons, N. 1997. *Male marine turtles: gene flow, philopatry and mating systems of green turtles Cheloniemydas*. Thesis, University of Queensland. Australia. 2241 pp.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids.Symp. Ser. 41:95-98.
- Hall, E. R. 1981. *The mammals of North America*. John Wiley and sons, New York.1181 pp.
- Irwin, D. M., Kocher,T. D. & Wilson, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32:128-144.
- Leopold, A. S. 1959. *Fauna Silvestre de México*. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México, D.F. 600 pp.
- López-Wilchis, R. 2003. *Base de datos de los mamíferos de México depositados en colecciones de Estados Unidos y Canadá*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. <http://investigacion.itz.uam.mx/mamiferos/>
- Martínez, C. L. 2007. Ecología molecular. Compiladores L. E. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre. INE, Semarnat, UNAM. México, pp. 88-160.
- Mas-Caussel, J. F., Velásquez-Montes,A. & Fernández-Vargas, T. 2005. Monitoreo de los cambios de cobertura del suelo en Michoacán. pp. 204-206. In: Villaseñor-Gómez,L. E. & Leal-Nares,O. A.(Eds.). *La Biodiversidad en Michoacán. Estudio de estado*. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, Gobierno del estado de Michoacán, Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente and Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

- Mercer, J. M. & Roth, V. L.** 2003. The Effects of Cenozoic Global Change on Squirrel Phylogeny. *Science*, 299:1568-1572.
- Oshida, T., Arslan,A. & Noda, M.** 2009. Phylogenetic relationships among the Old World *Sciurus* squirrels. *Folia Zoologica*, 58:14-25.
- Patterson, B. D., Ceballos, G., Sechrest, W., Tognelli, M. F., Brooks, T., Luna, L., Ortega, P., Salazar,I. & Young, B. E.** 2007. *Digital Distribution Maps of the Mammals of the Western Hemisphere*, version 3.0. NatureServe, Arlington, Virginia, USA
- Posada, D. & Crandall, K. A.** 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14:817-818.
- Sanger, F., Nicklen,S. & Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74:5463-5467.
- Secretaría de Educación del Estado de Michoacán.** 2003. *Atlas Geográfico del Estado de Michoacán*. Editora y distribuidora EDISSA, S. A de C. V. Michoacán, México
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales(SEMARNAT).** 2010. Norma Oficial Mexicana (NOMECOL-059-2010). 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 (30 de diciembre de 2010), México, D.F.
- Swofford, D. L.** 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and related methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M.,& Kumar, S.** 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Valdez-Alarcón, M.& Téllez-Girón G.** 2005. *Sciurus oculatus*. pp. 556-557. In:Ceballos, G. & Oliva,G. (Eds.). *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.