

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN DEL GORRIÓN
AMENAZADO Y ENDÉMICO DEL NORESTE DE MÉXICO: *Spizella wortheni*

Por


RICARDO CANALES DEL CASTILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN MANEJO DE VIDA SILVESTRE
Y DESARROLLO SUSTENTABLE

Octubre, 2010

BIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN DEL GORRIÓN
AMENAZADO Y ENDÉMICO DEL NORESTE DE MÉXICO: *Spizella wortheni*

Comité de Tesis



Dr. José Ignacio González Rojas

Director



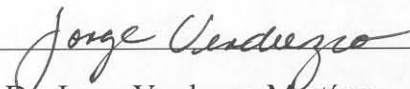
PhD. John Klicka

Director Externo



Dra. Susana Favela Lara

Secretario



Dr. Jorge Verduzco Martínez

Vocal



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

Vocal



Dr. Roberto Mercado Hernández

Vocal

Dedicada

A Irene, mi ángel, mi todo, mi otro yo.

A mi hijo Emiliano

A mis padres, Jesús Canales y Ana del Castillo, por su cariño, apoyo y guía.

A mi hermana Itzel Canales.

A Pipeta

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. José Ignacio González Rojas, por todo su apoyo y amistad a lo largo de este proyecto.

A John Klicka por su apoyo académico y amistad. A su esposa Barbara y sus hijos por su hospitalidad durante las estancias. A los alumnos de John: Markus (y Teresa Mika), Garth, Jeremy, Brian, Rebecca y Paul por siempre atender a mis preguntas con gran paciencia.

A la Dra Susana Favela Lara por su amistad y compartirme el proyecto de construir un laboratorio para estudiar todo lo que queramos.

A mis maestros ornitológicos: Jorge Schondube y Katherine Renton por su valioso curso de Ecología de Aves.

A mis maestros moleculares que aún después de tantos años aún me escuchan para aconsejarme: Dra. Diana Resendéz, MC. Claudio Moreno Rocha.

Al culpable para que buscara las respuestas evolutivas en campo y no en laboratorio: Dr. Jorge Verduzco Martínez.

A Rosa Bertha y su equipo de trabajo de Proyectos Especiales por siempre ayudarme y ser paciente en las cuestiones financieras.

Al Dr. Alejandro González y Dra Adriana Flores por permitirme usar sus instalaciones y equipo.

A los miembros de mi comité de tesis y al Dra Irene Ruvalcaba Ortega por los comentarios, la ayuda en los mapas y aportaciones hechas a este escrito.

Al Biól. Hugo Enrique Elizondo por su ayuda, en especial aquel primer años de trabajo. A los biólogos y amigos de varios años: Adriana, Adrian, Allen, Alina, Angel, Armando, Claudia, Cecilio, Beatriz, Cynthia, Javier Cruz, José Juan, Gabriel, Gustavo, Hidalgo, Mario, Victor por su colaboración, ayuda, amistad y enseñanzas.

Al personal de intendencia: Doña Leo, Doña Marina y Doña Tomy por ayudarme a iniciar un nuevo día con orden y limpieza.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León por los fondos aportados clave CN1691-06) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los fondos aportados clave 60331, que permitieron el término de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios (clave 48069).

A todos que aquellos que colaboraron de una u otra forma a la culminación de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS	9
Objetivo general.....	9
Objetivos particulares	9
1. CAPÍTULO 1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MOLECULAR DE UN GORRIÓN MEXICANO AMENAZADO: <i>Spizella wortheni</i>	10
1.1. INTRODUCCIÓN	11
1.1.1. Filogenia y sistemática del Género <i>Spizella</i>	11
1.1.2. Sistemática de <i>S. wortheni</i>	12
1.2. MÉTODOS	13
1.2.1. Selección de taxa	13
1.2.2. Extracción de ADN y amplificación	13
1.2.3. Protocolo filogenético	14
1.3. RESULTADOS.....	16
1.4. DISCUSIÓN	19
1.4.1. Relaciones filogenéticas del género <i>Spizella</i>	19
1.4.2. Relaciones filogenéticas de <i>S. wortheni</i>	20
1.5. LITERATURA CITADA	22
2. CAPÍTULO 2. CALIBRACIÓN DE LA TASA DE MUTACIÓN DEL DOMINIO I HIPERVARIABLE DE LA REGIÓN CONTROL MITOCONDRIAL EN LA FAMILIA EMBERIZIDAE	25
2.1. INTRODUCCIÓN	26

2.2. MÉTODOS	29
2.2.1. Selección de taxa	29
2.2.2. Tasa de mutación.....	29
2.3. RESULTADOS.....	30
2.4. DISCUSIÓN	31
2.5. LITERATURA CITADA	32
3. CAPÍTULO 3. DIVERSIDAD GENÉTICA E HISTORIA DEMOGRÁFICA DEL GORRIÓN AMENAZADO Y ENDÉMICO <i>Spizella wortheni</i>	35
3.1. INTRODUCCIÓN	36
3.2. MÉTODOS	38
3.2.1. Colecta y toma de muestras.....	38
3.2.2. Extracción de ADN genómico y amplificación	38
3.2.3. Diversidad genética e historia demográfica	39
3.3. RESULTADOS.....	43
3.4. DISCUSIÓN	50
3.5. LITERATURA CITADA	53
4. CAPÍTULO 4. ÉXITO REPRODUCTIVO Y NUEVOS SITIOS DE ANIDACIÓN DEL GORRIÓN <i>Spizella wortheni</i>	57
4.1. INTRODUCCIÓN	58
4.2. MÉTODOS	61
4.3. RESULTADOS.....	63
4.3.1. Actividad reproductiva 2006.....	63
4.3.2. Actividad reproductiva 2007	64
4.3.3. Éxito reproductivo.....	66
4.3.4. Preferencias de anidación.....	67
4.3.5. Descripción de los huevos.....	69
4.4. DISCUSIÓN	70
4.5. LITERATURA CITADA	73
CONCLUSIONES	75

APÉNDICE A.....	77
APÉNDICE B.....	78
APÉNDICE C.....	79
APÉNDICE D.....	81
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.1. Características de las secuencias de las taxa incluidas.....	16
2.1. Porcentaje de divergencia entre y dentro de linajes de gorriones y la tasa relativa de diferencia entre el dominio I de la región control y el gen codificante citocromo- <i>b</i> del ADNm.....	30
3.1. Variabilidad genética de la región control mitocondrial en las poblaciones de gorriones.....	44
3.2. Índices y tiempos de expansión poblacional.....	47
4.1. Porcentajes de nidos destruidos y depredados en distintas etapas.	66
4.2. Productividad del gorrión <i>S. wortheni</i> durante la temporada reproductiva 2007.	66
4.3. Probabilidad de supervivencia diaria y de éxito del gorrión <i>S. wortheni</i>	67

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Registros históricos y recientes del gorrión <i>Spizella wortheni</i>	5
1.1. Árbol de máxima verosimilitud (PAUP) de las secuencias concatenadas	18
3.1 Registros históricos y recientes del gorrión <i>Spizella wortheni</i>	42
3.2 Redes de haplotipos de las secuencias del dominio hipervariable de la región control mitocondrial.....	46
3.3 Distribución <i>mismatch</i> para todas las poblaciones	48
3.4 Distribuciones posteriores de θ estimada en las poblaciones de gorrones mediante el programa MDIV	49
4.1 Registros reproductivos confirmados del gorrión <i>S. wortheni</i> basados en su presencia, comportamiento o nidos	61
4.2 Nuevos registros reproductivos durante las temporadas 2006-2007 y sus atributos de vegetación	66
4.3 Nidos de <i>S. wortheni</i> monitoreados durante la temporada 2007 en ejido La Carbonera, Galeana NL	69
4.4 Preferencias de anidación del gorrión <i>S. wortheni</i>	70

RESUMEN

El gorrión *Spizella wortheni* es una especie asociada a los pastizales del Norte de México, y aunque históricamente se distribuyó en Nuevo México, EUA y en 8 estados de la República Mexicana, durante los últimos 50 años ha sufrido una severa contracción hasta distribuirse en una zona de apenas 25 km² entre los estados de Nuevo León y Coahuila. Actualmente, el tamaño de la población está estimado entre 100 y 120 individuos, por lo que se encuentra protegida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059,-SEMARNAT-2001) como amenazada, y está incluida en peligro de extinción en La Lista Roja de Especies en Peligro de Extinción (IUCN, 2010). El presente trabajo determina y evalúa desde el punto de vista de la Biología de la Conservación los siguientes objetivos: 1) La relación filogenética de *S. wortheni* dentro del género *Spizella* mediante marcadores moleculares, 2) Calcular los niveles de divergencia en el dominio I de la región control mitocondrial a tres niveles en un grupo de gorriones para 3) Estimar los parámetros genéticos demográficos inferidos a partir de secuencias de la región control y probar la hipótesis de que el gorrión *S. wortheni* ha pasado por un cuello de botella y 4) Buscar nuevos sitios de anidación y determinar sus parámetros reproductivos. El análisis filogenético de *S. wortheni* realizado mediante seis genes mitocondriales (3571 pb) usando máxima verosimilitud y probabilidad Bayesiana, indicando que a pesar de las similitudes superficiales, *S. wortheni* no es el taxón hermano de *S. pusilla*, y además que se encuentra más relacionado con *S. breweri*. También se presentan y se discuten nuevas relaciones filogenéticas del género *Spizella*. La divergencia de las secuencias región control mitocondrial comparadas con el gen citocromo-*b* en tres niveles taxonómicos dentro de la familia Emberizidae muestra que el dominio I de la región control evoluciona a un tasa 1.99 veces más rápido que el citocromo-*b*. Un valor conservador con respecto a los que se habían venido utilizando. A pesar de la dramática situación actual de *S. wortheni* se obtuvieron altos valores de diversidad genética similares a otros gorriones no amenazados, además de que no se observaron señales de un cuello de botella. Se discuten las posibilidades para mantener tal diversidad genética. Finalmente durante los meses de junio a julio del 2006-2007 se encontró actividad reproductiva en tres nuevas localidades: La Carbonera ($n=33$ nidos) y San Rafael ($n=2$) en el estado de Nuevo León, y San José del Alamito ($n=3$) en el estado de Coahuila. La mayor parte de los nidos fueron colocados en el arbusto *F. cernua*, seguido por *Opuntia* sp. y *O. imbricata*, finalmente por *Lycium* sp. Los parámetros y éxito reproductivo se estimaron a partir de 33 nidos monitoreados en La Carbonera. El tamaño de nidada fue de entre 2 y 4 huevos, siendo el promedio de la puesta de 3.22 ± 0.57 huevos. El 3.03% de los nidos ($n=1$) fueron destruidos durante la construcción, el 53.63% ($n=21$) depredado durante la puesta y el 33.33% ($n=11$) durante el cuidado parental. El porcentaje de infertilidad fue del 16.6% ($n=9$). Ningún nido fue exitoso. La estimación mediante Mayfield de éxito para todo el periodo fue de 9.56% (3.87% - 22.79%). La principal causa del fracaso reproductivo fue la depredación. Los resultados aquí presentados, tienen fuertes implicaciones en el manejo y conservación de la especie, dado que se trata de un taxón único que aún presenta altos valores de diversidad genética históricas, pero debido al bajo éxito reproductivo observado consideramos deben aplicarse medidas inmediatas para proteger las áreas reproductivas del gorrión *S. wortheni* y aumentar su probabilidad de éxito de anidación.

ABSTRACT

Worthen's Sparrow (*Spizella wortheni*) is a species associated to the grasslands of the North of Mexico, and although its historical range included New Mexico, USA and 8 states of Mexico, during the last 50 years it has suffered a severe contraction to merely distribute in 25 km² between Nuevo León and Coahuila states. Currently, population size is estimated between 100 and 120 individuals, and therefore it is protected by Mexican Laws (NOM-059,-SEMARNAT-2001) as threatened and listed by the Red List of Endangered Species (IUCN, 2010) as endangered. This study determines and evaluates, from the Conservation Biology point of view, the following objectives: 1) To establish the phylogenetic relationship of *S. wortheni* within *Spizella* genus using molecular markers, 2) To calculate divergence levels in the Domain I of the mitochondrial control region among three levels in a group of sparrows to 3) Estimate genetic demographic parameters inferred from control region sequences and to test the hypothesis that *S. wortheni* has suffered a bottleneck process, and 4) To look for new nesting sites and determine its basic reproductive parameters. Phylogenetic analysis was conducted using six mitochondrial genes (3571 bp) and maximum likelihood and Bayesian probability, indicating that despite superficial similarities, *S. wortheni* is not the sister taxon of *S. pusilla*, but it is more closely related to *S. breweri*. New phylogenetic relationships among *Spizella* genus are also presented and discussed. The divergence between mitochondrial control region and cytochrome-b gene at three taxonomic levels within Emberizidae family shows that the domain I of the control region evolves 1.99 times faster than cytochrome-*b*. This is a conservative value comparing with the rates that have been used in other studies. Despite the dramatic current situation of the Worthen's Sparrow, high genetic diversity values were obtained, similar to those from non-threatened sparrows, and no-signs of a bottleneck process were observed. Possibilities for maintaining a high genetic diversity are discussed. Finally, during June and July of 2006-2007 breeding activity was found in three new localities La Carbonera ($n=33$ nests) and San Rafael ($n=2$) in Nuevo León state, y San José del Alamito ($n=3$) in Coahuila state. Most of the nests were placed on *Flourensia cernua*, followed by *Opuntia engelmannii*, *O. imbricate*, and *Lycium* sp. Reproductive parameter and success were estimated from 33 monitored nests in La Carbonera. Clutch size ranged between 2 and 4 eggs, with a mean of 3.22 ± 0.57 . The 3.03% ($n=1$) of the nests were destroyed during construction, 56.63% ($n=21$) were predated during incubation and 33.33%, and 33.33% ($n=11$) during parental care. Infertility percentage was 16.6% ($n=9$). None of the nest was successful. Probability of nesting success estimation using Mayfield was 9.56% (3.87-22.79%). The main cause of failure was predation. The results shown here, have strong management and conservation implications for the species. It is a unique taxon with high historical genetic diversity values; however, the low observed breeding success, we recommend to apply immediate measures to protect the reproductive areas of *S. wortheni* and enhance its probability of nesting success.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de extinción de especies, que si bien es un proceso natural, se ha venido acelerando en los últimos tiempos debido a las actividades humanas, poniendo en riesgo una gran cantidad de taxa que se encuentran amenazadas y/o en inminente extinción. Se calcula que de manera natural, en el grupo de aves, se extinguía una especie cada 100 años. A partir del año 1500 y hasta 1900 la tasa de extinción aumentó a 30 cada 100 años, calculándose que se extinguieron 151 aves en este periodo. Sin embargo, a partir del año 1900, la tasa se duplicó, desapareciendo en ese siglo 61 especies (Wells, 2007). Actualmente, tan sólo en Norteamérica existen 43 especies de aves en peligro de extinción y/o vulnerables, y aproximadamente la tercera parte corresponden a aves que tienen afinidad por los pastizales ó pastos asociados a arbustos (IUCN, 2010). Más aún, existen poblaciones de aves de pastizal, que aunque no han alcanzado categoría de amenazadas, exhiben tendencias negativas en sus poblaciones, lo que ha llevado a suponer una crisis de conservación de vida silvestre para este siglo 21. No existe una sola causa para la declinación de las aves de pastizal, si no una suma de factores como lo son la fragmentación y la sustitución del pastizal por un paisaje agrícola moderno, principalmente (Brennan y Kuvlesky, 2005).

El gorrión *Spizella wortheni* es una de estas especies asociadas a los pastizales del Norte de México, y aunque históricamente se distribuyó en Nuevo México, EUA y en 8 estados de la República Mexicana, durante los últimos 50 años ha sufrido una severa contracción hasta distribuirse en una zona de apenas 25 km² entre los estados de Nuevo León y Coahuila (Figura 1). Actualmente, el tamaño de la población está estimado entre 100 y 120 individuos (Birdlife, 2010), por lo que se encuentra protegida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2001; SEMARNAT, 2002) como amenazada, y es considerada como en peligro de extinción en la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN, 2010). Se consideran a la

agricultura y el sobrepastoreo sus principales amenazas (Wege *et al.*, 1993), sin embargo, factores intrínsecos a la especie no han sido estudiados.

Las especies en riesgo de extinción frecuentemente enfrentan múltiples amenazas. Por lo tanto, las valoraciones y planeación para su preservación son complejas y requieren diversos enfoques como: la ecología, genética, biología de vida silvestre y de recursos naturales. La integración de éstas y más disciplinas han dado lugar a la Biología de la Conservación, que pretende estudiar la causas de la pérdida biológica en todos sus niveles (genética, individual, específica, ecosistémica) y de cómo minimizar esta pérdida (Groom *et al.*, 2006). En particular, existe una subdisciplina en la biología de la conservación, que trata con los factores genéticos que afectan el riesgo de extinción y con los regímenes de manejo requeridos para minimizar los riesgos (Frankham, 2002).

El gorrión *S. wortheni*, al igual que otras especies amenazadas, afrontan múltiples peligros que incluye cambios del medio ambiente, pequeño tamaño poblacional, estocasticidad ambiental, riesgo de endogamia y pérdida de diversidad genética. La endogamia puede afectar deletéreamente los rasgos asociados a la eficacia biológica, como la fecundidad y sobrevivencia, y por lo tanto incrementar el riesgo de extinción (Frankham y Ralls, 1998). Por su parte, la variabilidad genética puede interactuar con los efectos demográficos para producir el “vórtice a la extinción de las pequeñas poblaciones” (Gilpin y Soulé, 1986). Dado que los procesos demográficos y genéticos frecuentemente actúan sinérgicamente, la conservación de esta especie bien podría depender en la identificación, protección y restauración de áreas de anidación donde el éxito reproductivo sea suficiente para mantener la población (Hekert *et al.*, 2003). Una pérdida y fragmentación continua de su hábitat podrían aún mas afectar su ya reducida población

Es evidente que las relaciones evolutivas y sistemáticas del gorrión *S. wortheni*, no son claras. A pesar de que han sido inferidas a través de los caracteres morfológicos, éstas no se han probado usando métodos filogenéticos moleculares modernos. Para algunos autores, esta especie es el taxón hermano de *S. pusilla* ó una subespecie, dada la similitud superficial existente entre ambas (Burleigh y Lowery, 1942; Paynter, 1970). La identificación precisa y clasificación de un organismo es un prerequisite importante para su conservación (May, 1990). Por lo tanto, es prioritario asegurar el estatus taxonómico de *S. wortheni*.

Debido a lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se aborda la biología de la conservación del gorrión *S. wortheni* usando diferentes enfoques incluyendo la filogenia molecular, genética de poblaciones y ecología reproductiva. Se evaluó la posición filogenética de *S. wortheni* y los miembros naturales del género mediante el análisis del ADN mitocondrial (ADNm). Se calibró la tasa de mutación de la región hipervariable del Dominio I del ADNm, para posteriormente inferir los niveles de diversidad genética de *S. wortheni* (y de otros gorriones no amenazados) y evaluar los efectos de la declinación poblacional. Finalmente, se realizó un inventario de los sitios de anidación y se evaluó su éxito reproductivo.

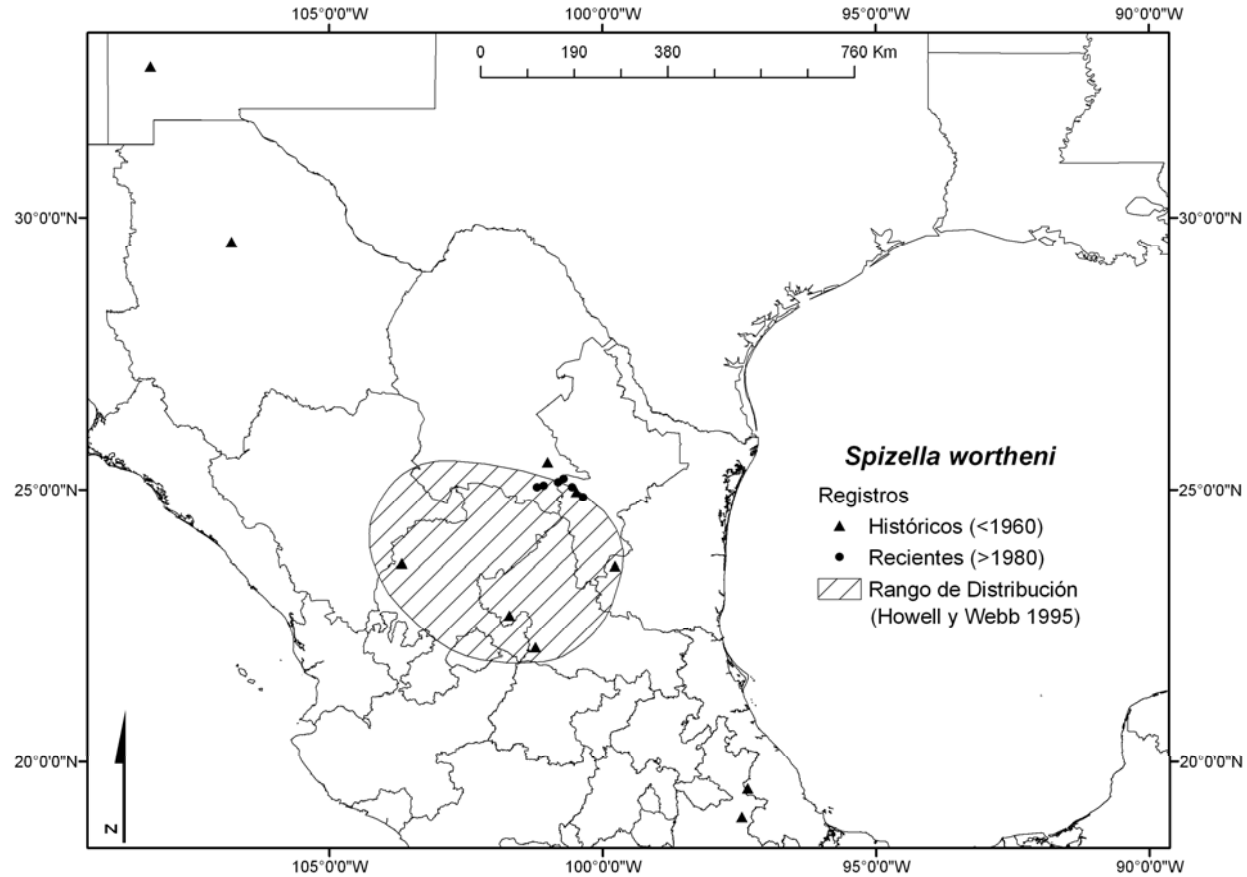


Figura 1. Registros históricos y recientes del gorrión *Spizella wortheni*. Históricamente esta especie se ha distribuido en Nuevo México (USA) y en 8 estados de la República Mexicana; el último registro en Puebla fue en 1893, Tamaulipas en 1924, San Luis Potosí en 1951, Veracruz en 1957, Chihuahua en 1959 y Zacatecas en 1961 (Wege *et al.*, 1993). El rango de distribución actual comprende el altiplano mexicano sin embargo, durante los últimos 30 años, esta especie solo se ha reportado en un pequeño territorio que comprende la zona colindante entre los estados de Nuevo León, y Coahuila.

LITERATURA CITADA

- BirdLife International. 2010. Species factsheet: *Spizella wortheni*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 27/9/2010.
- Brennan, LA, Kuvlesky WP. 2005. North American Grassland Birds: An Unfolding Conservation Crisis? *Journal of Wildlife Management* 69:1-13.
- Burleigh, TD, Lowery GH. 1942. Notes on the birds of southeastern Coahuila. *Occas.Pa. Mus. Zool. Louisiana State Univ.* 12:85-212.
- Frankham, R. y Ralls, K. 1998. Conservation biology: Inbreeding leads to extinction. *Nature* 392:441-442.
- Frankham, R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 12-23.
- Herkert, JR, Reinking DL, Wiedenfeld DA, Winter M, Zimmerman JL, Jensen WE. 2003. Effects of prairie fragmentation on the nest success of breeding birds in the midcontinental United States. *Conservation Biology*, 17:587-594.
- IUCN. 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 02 September 2010.
- Gilpin, ME, Soulé ME. 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. In M. Soule, ed. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. pp 19-34.
- Groom, MJ, Meffe GK y Carroll CR. 2006. *Principles of conservation biology*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. pp 13-20.
- Paynter, Jr, RA. 1970. Subfamily Emberizinae, Buntings and American sparrows. In: Paynter, Jr., R. A., Storer, R. W. (Eds.), *Check-list of Birds of the World*, vol. XIII. Museum of Comparative Zoology, Heffernan Press, Worcester, Massachusetts.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2001. 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. Secretaría de Gobernación, México, D. F. Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo de 2002. Available on: [http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/Normas Oficiales Mexicanas vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf](http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf)

May, RM. 1990. Taxonomy as destiny. *Nature* 347:129–130.

Wells, JV. 2007. *Birder's Conservation Handbook: 100 North American Birds at Risk*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. pp 10-14.

Wege, DC, Howell SNG, Sada, AM. 1993. The distribution and status of Worthen's Sparrow *Spizella wortheni*: a review. *Bird Conservation International* 3:211-220.

HIPÓTESIS

Las relaciones filogenéticas del género *Spizella* se resolverán con la inclusión del gorrión *S. wortheni*.

La variabilidad del dominio I de la región control mitocondrial será más alta que el del gen citocromo-*b* en los gorriones de la familia Emberizidae.

Dada la drástica disminución de la distribución del gorrión *S. wortheni* así como la reducción y fragmentación de su hábitat se observarán señales de declinación reciente y baja diversidad genética.

El éxito reproductivo y la tasa de reclutamiento del gorrión *S. wortheni* será bajo en un área sin manejo de conservación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar y describir aspectos de la filogenia, genética y ecología reproductiva del gorrión *Spizella wortheni*.

Objetivos específicos

Determinar la filogenia del género *Spizella* mediante marcadores mitocondriales.

Establecer una tasa de mutación de la región control mitocondrial en la familia Emberizidae mediante la comparación de ésta con el gen citocromo-*b*

Describir la diversidad genética e historia demográfica de la población endémica del gorrión *S. wortheni* mediante la región control mitocondrial.

Obtener un inventario de sitios reproductivos del gorrión *S. wortheni* en áreas adyacentes al Llano de la Soledad, en Galeana NL.

Determinar parámetros reproductivos básicos del gorrión *S. wortheni*.

CAPITULO 1

ANÁLISIS FILOGENÉTICO MOLECULAR DE UN GORRIÓN MEXICANO
AMENAZADO: *Spizella wortheni*.

RESUMEN

El gorrión de Worthen (*Spizella wortheni*) es una especie de ave endémica del Altiplano Mexicano que se encuentra bajo la protección de las leyes mexicanas. Debido al limitado rango de distribución, pequeño tamaño poblacional y su población en declive, se ha considerado como una de las aves de Norteamérica más amenazadas. A pesar de que se ha asumido de que es el taxón hermano de *S. pusilla*, las relaciones evolutivas y sistemática del gorrión de *S. wortheni* nunca han sido probadas usando modernas técnicas filogenéticas. Se aborda la filogenia molecular de *S. wortheni* mediante seis genes mitocondriales (3571 pb) con todos los miembros naturales del género *Spizella*. Los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos indican que a pesar de las similitudes superficiales, *S. wortheni* no es el taxón hermano de *S. pusilla*, sino que además se encuentra más relacionado con *S. breweri*. También se presentan y se discuten nuevas relaciones filogenéticas del género *Spizella*.

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Filogenia y sistemática del género *Spizella*.

Las relaciones filogenéticas y sistemática dentro del género norteamericano *Spizella* son controversiales, mientras algunos autores incluyen siete especies: *S. arborea*, *S. passerina*, *S. pallida*, *S. breweri*, *S. pusilla*, *S. wortheni* y *S. atrogularis* (AOU, 1957, 1998), otros consideran a *S. tavereni* como especie y no como subespecie de *S. breweri* (Sibley y Monroe, 1990; Klicka *et al.*, 1999). El género *Spizella* ha sido objeto de diversos estudios filogenéticos basados en caracteres morfológicos y marcadores moleculares. Sin embargo, todos ellos han fallado en reconstruir adecuadamente la filogenia de este grupo por varios factores. En un estudio sistemático basado en similitudes morfológicas publicado por Mayr y Short (1970), propusieron un “complejo passerina” conformado por *S. passerina*, *S. breweri* y *S. pallida*. La cercanía a este complejo era evidente por parte de *S. atrogularis*, *S. pallida* y *S. wortheni*, pero no para *S. arborea*, el cual aparentemente no pertenecía al género. Sin embargo, no pudieron establecer con claridad las relaciones existentes entre ellos. En el análisis de RFLP desarrollado por Zink y Dittman (1993) se sugirió que existían relaciones filogenéticas estrechas entre *S. atrogularis*-*S. pusilla* y *S. passerina*-*S. breweri*, a pesar de que esos nodos no estaban bien soportados. En un estudio posterior (Dodge *et al.*, 1995) basado en la secuencia de 433 bp del gen *cyt-b* se obtuvieron topologías similares a Zink y Dittman (1993), sin embargo, con sólo 33 sitios filogenéticamente informativos no se observó un soporte en los nodos. En un análisis filogenético de la familia Emberizidae utilizando caracteres morfológicos, oológicos y aloenzimas se resolvieron algunas relaciones a nivel de género, pero no claramente entre los miembros del género *Spizella*. En un estudio posterior de la familia Emberizidae, utilizando las secuencias de los genes mitocondriales ATP 6/8 y COIII, las relaciones entre los miembros del género variaron dependiendo de la técnica filogenética y aunque *S. breweri* y *S. passerina*

consistentemente aparecieron como taxones hermanos, esto se debió a una incorrecta identificación de estos especímenes (Carson y Spicer, 2003).

1.1.2 Sistemática de *S. wortheni*

El gorrión de Worthen, fue descrito originalmente como una especie por Ridgway (1884), a partir de un ejemplar colectado en Nuevo México, EUA. Sin embargo, este mismo autor, posteriormente, notó muchas semejanzas morfológicas con *S. pusilla* y concluyó que esta nueva especie estaba “sin lugar a dudas más cercanamente relacionada a *S. pusilla*” (Ridgway, 1901). Esta similitud, en morfología y plumaje, derivó en que posteriores autores reconocieran a *S. wortheni* como una subespecie de *S. pusilla* (Burleigh y Lowery, 1942; Paynter, 1970). Sin embargo, esta degradación a subespecie no fue aceptada, ya que incluso unos ejemplares colectados en el norte de Zacatecas fueron descritos como *S. wortheni browni* (Webster y Orr, 1954). En este sentido, varios autores han señalado diferencias en el plumaje, vocalización y en la apariencia que apuntan a que es una especie (Thayer, 1925; Webster y Orr, 1954; Behrstock *et al.*, 1998). Sin embargo, el grado de relación entre estas especies no ha sido resuelto, ya que en ninguno de los estudios filogenéticos realizados sobre el género ha incluido a *S. wortheni*, y se mantiene en duda si son miembros de un complejo “superespecie” (Sibley y Monroe, 1990; AOU, 1998) ó de un “grupo de especies” (Mayr y Short, 1970).

Dada la actual tendencia de declinación tanto en distribución como en número, se requiere de una valoración inmediata biológica y genéticamente de este taxón. Como primer paso, las relaciones evolutivas de este gorrión deben de ser determinadas y este es el objetivo primario de este trabajo. Más aún, se pretende determinar si *S. wortheni* es el taxón hermano de *S. pusilla* como ha sido supuesto, y si es así, qué tan diferentes son estas dos taxa genéticamente. El grado de los esfuerzos de conservación dirigidos al gorrión *S. wortheni* en el futuro muy bien podrían depender en si ésta representa una subespecie genéticamente indistinguible de *S. pusilla* o si es una especie biológicamente subestimada.

1.2 MÉTODOS

1.2.1 Selección de taxa

Con pocas excepciones, todos los miembros naturales del género *Spizella* fueron incluidos en este trabajo. *S. arborea* fue excluido debido a que en diversos estudios sistemáticos se ha reconocido su distante relación entre esta especie y sus supuestos congéneres (Dodge *et al.*, 1995; Mayr y Short, 1970; Patten y Fugate, 1998; Zink y Dittmann, 1993). De hecho, recientemente se sugirió que *S. arborea* se encuentra más estrechamente relacionada con *Passerella illiaca* que con el género *Spizella* (Carson y Spicer, 2003). *S. taverneri* también fue omitido en el estudio, la cual es considerada como especie por algunos autores (Swarth y Brooks, 1925; Sibley y Monroe, 1990) y por otros como una subespecie de *S. breweri* (AOU, 1998). Además, en un estudio sobre la relación evolutiva entre *S. breweri* y *S. taverneri* se encontró que son casi idénticos genéticamente (en el gen citocromo-*b*), a pesar de las diferencias en plumaje, vocalización y requerimientos ecológicos (Klicka *et al.*, 1999).

La selección del grupo externo es un paso crítico en la reconstrucción de los árboles filogenéticos (Swofford *et al.*, 1996). En la mayoría de los casos, el mejor grupo externo se compone de las taxa (o taxón) que está más cercanamente relacionado, pero que no forma parte del grupo interno (Smith, 1994). Por tal motivo, se escogió a *Chondestes grammacus* y *Amphispiza.bilineata* como grupos externos, ya que son miembros del clado hermano de *Spizella* (Carson y Spicer, 2003).

1.2.2 Extracción de ADN y amplificación

Para cada taxón las secuencias de los genes mitocondriales citcromo-*b*, ND2 (Subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa), COI (Subunidad I de la citocromo oxidasa), ATPase 6/8 (Subunidad 8 de la adenosine trifosfatasa) y CRI (Dominio I

hipervariable de la región control mitocondrial) fueron obtenidas a través del banco de genes o por secuenciación directa. Todas las taxa usadas, sus números de registro en museo y de acceso en el GenBank se enlistan en el Apéndice A.

El DNA genómico se obtuvo utilizando el KIT “DNAeasy Tissue Kit” siguiendo el protocolo de la casa comercial (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los fragmentos fueron amplificados en reacciones de 25 μ l bajo las siguientes condiciones estándar: desnaturalización a 94° C por 3 minutos, seguido de 36 ciclos de 94° C por 30 s, 48° C por 45 s y 72° C por 45 s. Seguido finalmente por una extensión de 72° C durante 10 minutos. Los fragmentos del gen citocromo-*b* y ND2 fueron amplificados vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando los oligonucleótidos que se describen en DaCosta *et al.* (2009). Los oligonucleótidos CO2GQL y CO3HMH (Greenberg *et al.*, 1998) fueron usados para amplificar el gen ATP6/8; el fragmento del COI fue amplificado con el par de oligonucleótidos BirdR1 y BiedR2 (Hebert *et al.*, 2004) y finalmente la región control fue amplificada con los oligonucleótidos H417 y LG12 (Tarr, 1995).

Los productos amplificados fueron purificados utilizando el kit “Rapid PCR Purification System” (Marligen Biosciences Inc, Ijamsville, MD, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los fragmentos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos, utilizando los mismos oligonucleótidos con los cuales se amplificaron, en el Instituto de Biología (UNAM), en el laboratorio del Marjorie Barrick Museum (University of Nevada, Las Vegas) ó por el servicio de secuenciación Macrogen USA (Rockville, Maryland). Las hebras complementarias de cada gen se alinearon usando el programa Sequencher 4.1 (GeneCodes). No se observaron inserciones, deleciones en las secuencias alineadas y todos los datos codificantes fueron traducidos en su forma aminoacídica utilizando el programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Las secuencias obtenidas incluyen la mayor parte de los genes antes mencionados y fueron concatenadas para cada especie resultando en una secuencia de 3571 pb.

1.2.3 Protocolo filogenético

La dinámica evolutiva para cada gen fue examinado en cada taxa. El número de sitios variables, el número de sitios filogenéticamente informativos y la tasa evolutiva relativa fueron calculados utilizando el programa PAUP 4.0b10 (Swofford,

2002). Matrices independientes de distancia fueron construidas para cada gen. Distancias entre especies y clados fueron calculadas con Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Las hipótesis filogenéticas fueron construidas utilizando los métodos de máxima verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) y Bayesianos. El mejor modelo de ajuste de evolución fue determinado para cada gen por separado y las secuencias concatenadas bajo el Criterio de Información Akaike (AIC por sus siglas en inglés) utilizando el programa jModeltest (Posadas, 2008). El árbol ML fue construido a partir de los datos combinados con el modelo evolutivo y los parámetros previamente indicados. La topología obtenida con las secuencias concatenadas fue usada para probar la desviación de la tasa evolutiva tipo reloj usando la prueba de relación de verosimilitud. El soporte de los nodos fue evaluado vía “*bootstrap*” con 200 pseudo-replicaciones usando una búsqueda total heurística. Una serie de tres análisis Bayesianos fueron llevados a cabo: 1) Un sólo modelo evolutivo fue aplicado a las secuencias concatenadas (análogo al análisis de ML); 2) Los datos fueron particionados por gen (5 particiones) y se aplicaron modelos evolutivos específicos a cada gen; y, 3) un análisis específico por codón (13 particiones). Para cada análisis se realizaron cuatro cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC por sus siglas en inglés) y 3, 000,000 de generaciones. Se realizó un muestreo cada 100 generaciones, resultando un total de 30,000 árboles. Los primeros 10,000 árboles fueron descartados, por corresponder a las 1, 000,000 generaciones (*burn-in*, por su término en inglés). Los restantes 20,000 árboles de cada análisis fueron usados para construir el árbol consenso por la regla de la mayoría (*majority rule*, por su término en inglés). El consenso incluye los grupos monofiléticos que aparecen en al menos el 50% de los árboles más cortos. Aquellos nodos que tuvieran probabilidades posteriores mayores al 95% (Bayesianos) ó valores “*bootstrap*” (ML) mayores del 70% fueron considerados bien soportados.

1.3 RESULTADOS

La longitud total de las secuencias concatenadas fue de 3571 pb de los cuales 398 sitios fueron variables, 165 de ellos filogenéticamente informativos (Tabla 1.1). Las distancia genéticas entre el grupo *Spizella* fueron similares. Por ejemplo, para citocromo-*b*, la distancia mínima sin corrección fue de 4.4% (*S. wortheni* – *S. breweri*) mientras que la mayor fue del 6.7% (*S. atrogularis* – *S. breweri*). Los valores Log de verosimilitud obtenidos del análisis ML con y sin el supuesto de un reloj molecular no variaron significativamente ($-2 \log \Delta = 9.494$, $X^2 = 0.5 > P > 0.1$).

Tabla 1.1 Características de las secuencias de las taxa incluidas. Los sitios filogenéticamente informativo y tasa de mutación relativa fueron calculados sólo con el género *Spizella*. El mejor modelo de ajuste de la dinámica evolutiva y distribución gamma (cuando fue posible) se calculó para cada gen incluyendo el grupo externo.

Posición	Número de sitios	Sitios variables	Filogenéticamente informativos	Tasa relativa	Modelo de evolución	Ts/Tv	α
Cyt- <i>b</i>	765	72	30	1.0	GTR + I	-	-
ND2	1030	133	60	1.4	GTR + I	-	-
ATP8/6	841	101	39	1.2	GTR + G	-	0.130
COI	599	53	24	1.0	GTR + G	-	0.028
CR	328	39	12	1.2	HKY + G	2.18	0.198
Todos	3571	398	165	1.2	GTR + I	-	-

Todos los análisis filogenéticos concordaron en la misma topología y sólo difirieron ligeramente en el grado de soporte en el nodo (Figura 1.1). En total, cuatro de los cinco nodos totales del árbol están bien soportados. A pesar de la similitud superficial, *S. wortheni* no es el taxón hermano de *S. pusilla*, si no que está más

relacionado con *S. breweri* (Figura 1.1 nodo E). Estos tres taxa conforman un clado bien resuelto (Figura 1.1 nodo D) en una posición terminal del árbol, mientras que *S. passerina* ocupa una posición basal, y por lo tanto es especie hermana de todos los congéneres. La relación relativa entre *S. pallida* y *S. atrogularis* es menos certera debido a la falta de soporte en el nodo central (Figura 1.1 nodo C). La falta de resolución en el nodo provoca una politomía que incluye a *S. pallida*, *S. atrogularis* y el ensamblaje *S.pusilla-S.breweri-S.wortheni*.

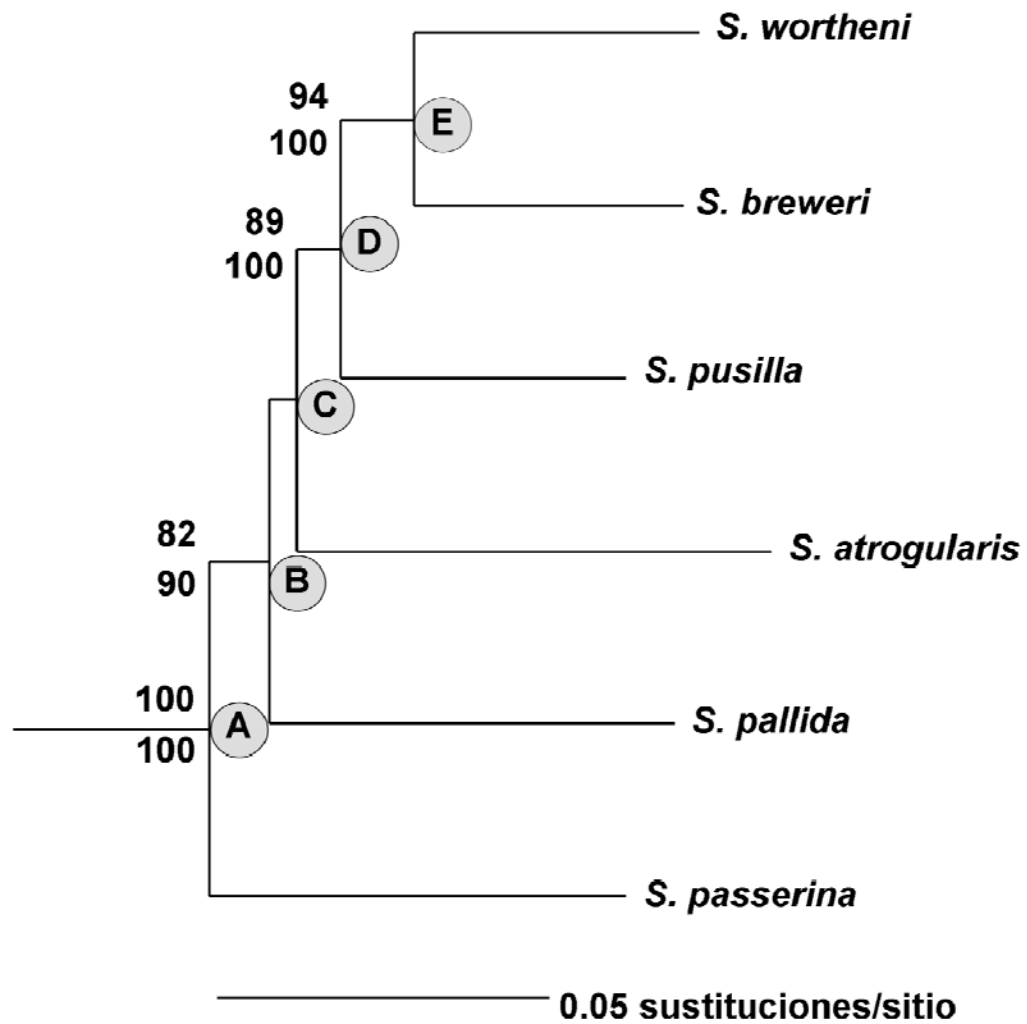


Figura 1.1. Árbol de máxima verosimilitud (PAUP) de las secuencias concatenadas. Los números mostrados en cada uno de los nodos (A-E) muestran el soporte derivado de 200 repeticiones *bootstrap* (arriba) y su significancia (>95%, abajo) de soporte posterior Bayesiana. El árbol fue enraizado con *Chondestes grammacus* y *Amphispiza bilineata*.

1.4 DISCUSIÓN

1.4.1 Relaciones filogenéticas del género *Spizella*

Los diversos estudios filogenéticos de los que ha sido objeto el género *Spizella* han fallado en reconstruir adecuadamente la filogenia de este grupo por el escaso número de caracteres utilizados y no ser inclusivos con todos los miembros del grupo, lo que provocó que las topologías recuperadas carecieran de soporte estadístico (Zink y Dittman, 1993; Dodge *et al.*, 1995). A diferencia de estos trabajos previos se presenta una hipótesis filogenética inclusiva basada en secuencias mitocondriales de todos los miembros (válidos) del grupo y además con un incremento substancial de datos. Específicamente *S. wortheni* y *S. breweri* aparecen como taxa hermanas y forman un grupo con *S. pusilla*, todas estas relaciones sustentadas con altos valores de soporte. Las relaciones entre *S. pallida* y *S. atrogularis* se encuentran indefinidas pero ambas están relacionadas con el complejo anteriormente mencionado. En cambio, *S. passerina* es el miembro más distante del grupo. Esta nueva hipótesis del grupo difiere de la previamente presentada por Dodge y colaboradores (1995). Para evaluar cual sería la causa de las diferencias en los resultados, se realizaron dos tipos de búsqueda de ML (con un modelo GTR + I de evolución) usando las secuencias originales del citocromo-*b* publicadas por Dodge y colaboradores e incluyendo a *S. wortheni*: una con *Junco hyemalis* como grupo externo y en la otra con los grupos externos *C. grammacus* y *A. bilineata*. Interesantemente, en ambos casos la topología del árbol recuperada fue idéntica a la primera hipótesis generada, pero sin soporte estadístico, sugiriendo que la selección del grupo externo no fue un criterio determinante en la topología. En cambio, la inclusión de *S. wortheni*, la ejecución de una búsqueda por ML en lugar de un análisis por parsimonia y el considerable aumento de la información ayudó a obtener nodos bien soportados en la presente hipótesis. La falta de resolución en el nodo central, reflejado como una politomía puede ser consecuencia de la reciente expansión del grupo (Figura 1.1). El origen de la radiación de este grupo es de

aproximadamente 2.7 millones de años, lo cual se obtuvo utilizando la distancia genética sin corrección del gen citocromo-*b* entre los *Spizella* que es de 5.55% y asumiendo un reloj molecular de 2%/millón de años. Esto coincide aproximadamente con el inicio de los ciclos glaciares en Norteamérica (Klicka y Zink, 1997). En tal periodo de tiempo hubo un decremento en la temperatura que causó un aumento en el hábitat de matorral desértico en el Desierto Chihuahuense (Riddle, 1995).

1.4.2 Relaciones filogenéticas de *S. wortheni*

Dado el evidente gran parecido que existe entre *S. wortheni* y *S. pusilla*, Ridgway (1901) consideró que *S. wortheni* debería de estar relacionado a *S. pusilla arenacea*. Especie de la cual, apenas se diferencia por tener bandas en las alas menos distintivas, un disminuido parche post-ocular y la presencia de un anillo ocular blanco. Sin embargo, estas diferencias no fueron suficientes para garantizar su estatus como especie, ya que Burleigh y Lowery (1942) declararon “Cada carácter que define a *S. wortheni*, se encuentra intermedio entre *S. p. pusilla* o *S. p. arenacea*”. Como consecuencia, *S. wortheni* fue relegado como subespecie de *S. pusilla*. Webster y Orr (1954) difirieron con este cambio de estatus taxonómico y basándose en nuevos especímenes colectados, notaron un número de características en el plumaje y vocalización que distinguían a *S. wortheni* de *S. pusilla*. Estas diferencias en el canto han sido notadas también por otros autores que han sugerido que el canto de *S. wortheni* suena a una combinación entre *S. pusilla* y *S. passerina* (Wege *et al.*, 1993; Behrstock *et al.*, 1997). En el presente análisis filogenético con ADN mitocondrial revela que *S. wortheni* no es co-específico con *S. pusilla* y no forma parte de un “complejo superespecie” con él (Sibley y Monroe, 1990; AOU, 1998). En cambio, *S. wortheni* es el taxón hermano de *S. breweri*, un gorrión sin marcas destacables y con el cual no comparte características similares. A pesar de que esta relación no había sido predicha por ningún estudio taxonómico en el pasado, tiene el mayor soporte estadístico de todo el análisis. Asimismo, otra estrecha relación entre *S. breweri* y *S. pallida*, que presentan características similares, no fue posible reconstruirla en el presente análisis. Estas discrepancias entre morfología y la reconstrucción filogenética molecular llevan a pensar que debido a que estos gorriónes ocupan hábitats similares, sus plumajes deben de estar bajo una fuerte presión selectiva que los conlleva a presentar características similares. En cualquier

caso, los caracteres de plumaje han fallado en reconstruir adecuadamente las relaciones filogenéticas. Numerosos estudios recientes en aves han demostrado diferencias entre las filogenias producidas a partir de datos moleculares y aquellas basadas en morfología (eg. Klicka y Spellamn, 2007; DaCosta *et al.*, 2009).

LITERATURA CITADA

- American Ornithologists' Union, 1998. Check-list of North American Birds, Seven edition. American Ornithologists' Union, Washington, D.C.
- Behrstock, RA, Sexton CW, Lasley GW, Eubanks TL, Gee JP. 1997. First nesting records of Worthen's Sparrow *Spizella wortheni* for Nuevo León, México, with a habitat characterization of the nest and notes on ecology, voice, additional recent sightings and leg coloration. *Cotinga* 8:27-33.
- Burleigh, TD, Lowery GH. 1942. Notes on the birds of southeastern Coahuila. *Occas.Pa. Mus. Zool. Louisiana State Univ.* 12:85-212.
- Canales-Del Castillo, R, González-Rojas JI, Ruvalcaba-Ortega I, Garcia-Ramirez A. 2010. New breeding localities of Worthen's Sparrows in northeastern Mexico. *Journal of Field Ornithology* 81:5-12.
- Carson, RJ, Spicer GS, 2003. A phylogenetic analysis of the emberizid sparrows based on three mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 29:43-57.
- DaCosta, JM, Spellman GM, Escalante P, Klicka J. 2009. A molecular systematic revision of two historically problematic songbird clades: *Aimophila* and *Pipilo*. *J. Avian Biol.* 40:206-216.
- Dodge, AG, Fry AJ, Blackwell RC, Zink RM. 1995. Comparison of phylogenies derived from two molecular data sets in the avian genera *Pipilo* and *Spizella*. *Wilson Bull.* 107:641-654.
- Garza de León, AI, Morán Rosales F, Cancino de la Fuente F, Tinajero Hernández R, López de Aquino S. 2007. Parámetros reproductivos y nueva localidad de anidación para el gorrión de Worthen (*Spizella wortheni*) en el estado de Coahuila, México. *Ornitología Neotropical* 18:243-249.
- Greenberg, R, Cordero P, Droege S, Fleisher R. 1998. Morphological adaptation with no mitochondrial DNA differentiation in the plain swamp sparrow. *The Auk* 115:706-712.
- Hebert, PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol.* 2:1-7.

- Klicka, J, Zink RM. 1997. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science* 277:1666-1669.
- Klicka, J, Zink RM, Barlow JC, McGillivray WB, Doyle TJ. 1999. Evidence supporting the recent origin and species status of the Timberline Sparrow. *Condor* 101:577-588.
- Klicka, J, Spellman GM. 2007. A molecular evaluation of the North American “grassland” sparrow clade. *Auk* 124:537-551.
- Mayr, E, Short LL. 1970. *Species Taxa of North American Birds*. Publications of the Nuttall Ornithological Club, No. 9. Cambridge, Massachusetts.
- Patten, MA, Fugate M. 1998. Systematic relationships among emberizid sparrows, *The Auk* 115:412-424.
- Paynter, RA, Jr. 1970. Subfamily Emberizinae, Buntings and American sparrows. In: Paynter, Jr., R. A., Storer, R. W. (Eds.), *Check-list of Birds of the World*, vol. XIII. Museum of Comparative Zoology, Heffernan Press, Worcester, Massachusetts.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256.
- Rojas-Soto, OR, Navarro-Sigüenza A, Espinosa de los Monteros A. 2009. Systematics and bird conservation policies: the importance of species limits. Bird Conservation International, Published online by Cambridge University Press.
- Riddle, BR. 1995. Molecular biogeography in the pocket mice (*Perognathus* and *Chaetodipus*) and grasshopper mice (*Onychomys*): The late Cenozoic development of a North American aridlands rodent guild. *Journal of Mammalogy* 76:283-301.
- Ridgway, R. 1884. Description of a new species of Field-Sparrow from New Mexico. *Proc. U. S. Nat. Muse.* 7:259.
- Ridgway, R. 1901. *Birds of North and Middle America*. U. S. National Muse, Bull. 50:1.
- Rising, JD. 1996. *A guide to the identification and Natural History of the sparrows of the United States and Canada*. Academic Press, San Diego, California.

- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2001. 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. Secretaría de Gobernación, México, D. F. Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo de 2002. Available on: [http://www.semarnat.gob.mx/leyesyformas/Normas Oficiales Mexicanas vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf](http://www.semarnat.gob.mx/leyesyformas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf)
- Sibley, CG, Monroe BL. 1990. Distribution and taxonomy of the birds of the world. Yale Univ. Press, New Haven, CT.
- Swarth, HS, Brooks A. 1925. The Timberline Sparrow, a new species from Northwestern Canada. *Condor* 27:67-69.
- Swofford, DL. 2002. PAUP_ Version 4.0b10: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599.
- Tarr, CL. 1995. Primers for amplification and determination of mitochondrial control-region sequences in oscine passerines. *Mol. Ecol* 4:527-529.
- Wege, DC, Howell SNG, Sada, AM. 1993. The distribution and status of Worthen's Sparrow *Spizella wortheni*: a review. *Bird Conservation International* 3:211-220.
- Webster, JD, Orr RT. 1954. Summering birds of Zacatecas, Mexico, with a description of a new race of Worthen Sparrow. *Condor* 56:155-160.
- Zink, RM, Dittmann DL. 1993. Population structure and gene flow in the Chipping Sparrow and a hypothesis for evolution in the genus *Spizella*. *Wilson Bull.* 105:399-413.

CAPITULO 2

CALIBRACIÓN DE LA TASA DE MUTACIÓN DEL DOMINIO I HIPERVARIABLE DE LA REGIÓN CONTROL MITOCONDRIAL EN LA FAMILIA EMBERIZIDAE

RESUMEN

El ADN mitocondrial (ADNm) es por mucho el marcador más utilizado para evaluar la diversidad molecular en animales, y parte de su utilidad radica en el supuesto de que evoluciona de manera casi neutral y más rápidamente que el ADN nuclear, además de que su tasa de substitución, en los genes codificantes, es parecida a un reloj molecular. Se ha supuesto que la región control es el segmento del ADNm que más rápidamente evoluciona, particularidad útil para inferir la historia de las poblaciones en cortos periodos de tiempo. Sin embargo, en el grupo de las aves, existen pocas calibraciones y en su mayoría se han utilizado tasas de substitución de otros grupos ó empíricas. Por tal motivo, en el presente trabajo se estimaron los niveles de divergencia en el dominio I de la región control mitocondrial a tres niveles en un grupo de gorriones: divergencia intra-específica en *Spizella breweri*, inter-específica entre los gorriones del género *Spizella*, y en un grupo taxonómico mayor en nueve géneros de la Familia Emberizidae. La comparación de estos valores con la tasa de mutación de un gen bien calibrado como el citocromo-*b*, muestra que el dominio I de la región control evoluciona a un tasa de 1.99 veces más rápida que el citocromo-*b*. Un valor conservador con respecto a los que se habían venido utilizando, por lo tanto se sugiere estimar tasas de divergencia entre estos genes en cada grupo de interés.

2.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años el ADNm es por mucho el marcador más usado para evaluar la diversidad molecular en animales. Las razones para adoptar este marcador son: es relativamente fácil de amplificar al aparecer en múltiples copias en la célula; los genes contenidos en la mitocondria están fuertemente conservados entre los animales, con pocas excepciones, sin intrones, y con cortas regiones inter-génicas; y su herencia es clonal (maternal), lo que significa que todo el genoma se comporta como un sólo locus, sin recombinación (Gissi *et al.*, 2008). Asimismo, se ha asumido que el ADNm evoluciona de una manera casi neutral debido a que está involucrado en funciones metabólicas básicas (respiración) por lo que los genes codificantes están menos involucrados en procesos adaptativos. Finalmente, se ha establecido que la tasa de evolución de ADNm es como un reloj, en ausencia de cualquier mutación bajo selección positiva y sólo con mutaciones neutrales (y ligeramente deletéreas) que se acumulan a lo largo del tiempo, por lo que los niveles de divergencia del ADNm deben reflejar el tiempo de separación (para una revisión ver Galtier *et al.*, 2009).

Este reloj molecular, utilizado para datar linajes mitocondriales, está basado en el supuesto de que las mutaciones acumuladas en el genoma mitocondrial a lo largo del tiempo varían a una tasa que puede ser calibrada con fechas absolutas derivadas de fósiles o de evidencia geológica. Asimismo, el ADNm tiene una tasa de mutación mayor que el DNA nuclear, lo que la ha convertido en una de las herramientas más ampliamente utilizada para investigar el tiempo en que ocurrieron eventos filogenéticos (Lovette, 2004). Ante la ausencia de otros métodos, el reloj molecular no sólo se ha usado para datar el origen de los grupos taxonómico sino también para determinar el impacto de los eventos geológicos y climáticos en la diversificación, estimar tasas de especiación y extinción, y determinar el tiempo de eventos de dispersión y el origen de las familias de genes (Para una revisión, ver Weir y Schluter, 2008). Sin embargo, la premisa de que la evolución molecular sucede a una tasa constante a través del tiempo en los grupos taxonómico es aún

controversial, y a la fecha pocas calibraciones se han obtenido para el ADNm en aves (Lovette, 2004). Sin embargo, si se ha establecido una tasa de divergencia para el gen citocromo-*b* de 2.1 por millón de años (0.1%, 95% de intervalo de confianza (para revisiones al tema ver: García-Moreno, 2004; Lovette, 2004; Weir y Schluter, 2008).

La región control mitocondrial es una secuencia de longitud variable no codificante que contiene los promotores para la transcripción en vertebrados. Se ha clasificado con base en la variabilidad de sus nucleótidos en tres dominios. El dominio II, el cual se encuentra conservado y está flanqueado por los dominios I y III. La mayor parte de la variabilidad dentro de la región control se concentra en estos últimos, los cuales en conjunto muestran un elevado número de sustituciones nucleotídicas y variación en longitud comparada con el dominio II (para una revisión, ver Baker y Marshall, 1997).

La región control del ADNm se ha convertido en uno de los marcadores más comúnmente usados para el estudio de la filogenia de especies cercanamente relacionadas y sus estructuras poblacionales. El amplio interés en el uso de este marcador radica en el supuesto de que la región control es la parte con mayor velocidad en evolución del ADNm, de hasta 5-10 veces superior en la tasa de sustitución comparada con el resto de la molécula (Aquadro y Greenberg, 1983). Estimaciones en dos especies de aves de la tasa de mutación de la región control sugiere que es tan variable como 20.8% y 30 % sustituciones por sitio por millón de años⁻¹, en pingüinos y gansos, respectivamente (Lambert *et al.*, 2002; Quinn, 1992). Sin embargo, otros estudios sugieren que la región control evoluciona aproximadamente a la misma tasa que las transiciones del citocromo-*b* (Zink y Blackwell, 1998). En un estudio sobre la estructura y evolución de la región control mitocondrial en varios órdenes de aves se encontró que la proporción de divergencia entre comparaciones pareadas de la región control y citocromo-*b* varía entre 0.13 y 21.65, indicando que la región control no es siempre la parte más variable del ADNm, y que además, también existen diferencias en la tasa de divergencia entre los linajes (Ruokonen y Kvist, 2002).

El uso de marcadores mitocondriales con altas tasas de divergencia se ha utilizado para generar conocimiento acerca de la historia de las poblaciones en cortos periodos de tiempo, en particular con la región control del ADNm. Debido a esto, resulta crucial para escalar los valores genéticos en biológicamente significativos, tener una adecuada tasa de mutación calibrada en el grupo taxonómico estudiado ó

por lo menos con los más cercanos filogenéticamente. El cálculo de la tasa de mutación en la región control puede presentar dificultades por los altos niveles de homoplasia en tiempos de divergencia relativamente tempranos. Para evitar la influencia de la homoplasia en la región control, es importante calibrar la tasa de mutación mediante la comparación de divergencias entre pares de especies cercanamente relacionados o entre individuos de la misma especie (Peters *et al.*, 2005). Por tal motivo, en el presente trabajo se estimaron los niveles de divergencia en el dominio I de la región control mitocondrial a tres niveles en un grupo de gorriones: divergencia intra-específica en *Spizella breweri* (nivel poblacional), inter-específica entre los gorriones del género *Spizella* y en un grupo taxonómico mayor en nueve géneros de la Familia Emberizidae. La comparación de estos valores con la tasa de mutación de un gen bien calibrado como el citocromo-*b*, permitirá conocer los rangos de variación y estimar la tasa de mutación de la región control.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Selección de taxa

Todas las secuencias fueron obtenidas del banco de genes (GenBank, las especies y número de accesos se muestran en la tabla en el Apéndice B). Se incluyó un miembro de cada especie para los que las secuencias de los genes región control y citocromo-*b* hubiesen estado disponibles en el banco de genes. Las secuencias seleccionadas consistían en el dominio I de la región control del ADNm completo y una porción del dominio II, con un total de 328 pb. De igual manera, se eligieron secuencias parciales del gen citocromo-*b* de 663 pb. Las secuencias se alinearon utilizando el programa Mega 4.1 (Tamura *et al.*, 2007), no observándose inserciones y/o deleciones

2.2.2 Tasa de mutación

Para calibrar la tasa de mutación del dominio I de la región control del ADNm se comparó el porcentaje de divergencia entre éste y el porcentaje de divergencia en regiones codificantes del ADNm en cada uno de los niveles taxonómicos; a nivel intra-específico en *S. breweri* (6 especímenes), inter-específico con los miembros naturales del género *Spizella* (5 taxa) y dentro de la Familia Emberizidae (9 géneros). El porcentaje de divergencia fue corregido en todos los casos con el modelo HKY en PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002).

Una vez obtenida la tasa relativa entre las divergencias de cada gen se multiplicó por la tasa de mutación del gen citocromo-*b* (2.07%), que es el porcentaje de divergencia por millón de años para el orden Passeriformes (Weir *et al.*, 2008).

2.3 RESULTADOS

Basado en las comparaciones pareadas, el dominio I de la región control muta a diferentes tasas. La mayor divergencia se observó a nivel poblacional con una tasa relativa con respecto al gen citocromo-*b* de 3.77 más rápida. En cambio, a nivel de género y familia, la tasa de divergencia es muy similar a la del gen codificante (0.812 y 1.011 respectivamente; Tabla 2.1). En promedio, el dominio I de la región control evoluciona a un tasa 1.99 veces más rápida que el citocromo-*b*. Si se considera que el citocromo-*b* evoluciona a 2.07% de divergencia por millón de años, entonces la región control evoluciona a una tasa de divergencia del 4.11% por millón de años ó a una tasa de 2.05×10^{-8} sustituciones por sitio por año (s/s/a).

Tabla 2.1. Porcentaje de divergencia entre y dentro de linajes de gorriones y la tasa relativa de diferencia entre el dominio I de la región control y el gen codificante citocromo-*b* del ADNm. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Comparación	Proporción de divergencia*		
	Región codificante (citocromo- <i>b</i>)	Región Control (Dominio I)	Diferencia relativa entre la región control y regiones codificantes.
Divergencia inter- específica de Emberizidae	0.0959 (0.0138)	0.1278 (0.0304)	1.33
Divergencia inter- específica de <i>Spizella</i>	0.0772 (0.0232)	0.0673 (0.0007)	0.87
Divergencia intra- específica de <i>S.</i> <i>breweri</i>	0.0016 (0.0004)	0.0061 (0.0027)	3.77
Promedio			1.99

2.4. DISCUSIÓN

Diversos estudios, con el grupo de los mamíferos, han mostrado que la parte que más rápidamente evoluciona en la mitocondria es la región control (Aquadro y Greenberg, 1983; Cann *et al.*, 1984; Chang y Clayton, 1995; Walberg y Clayton, 1981) y de igual manera sucede en algunos grupos de aves (Wenink *et al.*, 1993; Tarr, 1995; Baker y Marshall, 1997). Por tal motivo, se ha asumido que en todos los grupos de aves la región control tiene la mayor tasa de substitución, similar en magnitud que en mamíferos, que podría variar entre 0.01 hasta 0.30 substituciones/sitio/millón de años (Baker y Marshall, 1997; Quin, 1992; Lambert *et al.*, 2000; Bulgin *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha documentado que la tasa de evolución de la región control es equivalente ó menor inclusive que el citocromo-*b* en cierto grupos de aves (Zink y Blackwell, 1998; Zink *et al.*, 2003), además de que parece variar considerablemente entre taxa (Ruokonen y Kvist, 2002). A pesar de lo anterior, en algunos trabajos consideran que tasas similares al citocromo-*b* son muy bajas y sitúan rangos de manera empírica de 0.1 hasta 0.3 substituciones/sitio/millón de años (Milá *et al.*, 2006; Milá *et al.*, 2007; Peres-Tris *et al.*, 2004). El cálculo promedio obtenido de evolución de la región control, en la familia Emberizidae, es de 0.021 substituciones/sitio/millón de años, un valor conservador comparado con los comúnmente usados con anterioridad en gorriones (Milá *et al.*, 2006; Milá *et al.*, 2007; Bulgin *et al.*, 2003). Por lo tanto, extrapolar porcentajes de divergencia entre grupos no debería ser lo adecuado y se sugiere calcular las tasas de divergencia en cada grupo de estudio.

LITERATURA CITADA

- Aquadro, CF, Greenberg BD. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103:287–312
- Baker, AJ, Marshall HD. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: Mindell, D.P. (Ed.), *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academia Press, San Diego, pp. 51–82.
- Bulgin, NL, Gibbs HL, Vickery P, Baker AJ. 2003. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Molecular Ecology* 12:831–844.
- Cann, RL, Brown WM, Wilson AC. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106:479–499.
- Chang, D, Clayton D. 1985. Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:351–355.
- García-Moreno, J. 2004. Is there a universal mtDNA clock for birds? *Journal of Avian Biology* 35:465–468
- Galtier, N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GD. 2009b. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18:4541–4550.
- Gissi, C, Iannelli F, Pesole G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101: 301-320.
- Lambert, DM, Ritchie PA, Millar CD et al. 2002. Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Science* 295:2270–2273.
- Lovette, IJ. 2004. Mitochondrial dating and mixed support for the “2% rule” in birds. *Auk* 121: 1-6.
- Milá, B, Smith TB, Wayne RK. 2006. Postglacial population expansion drives the evolution of long-distance migration in a songbird. *Evolution* 60:2403–2409.

- Milá, B, McCormack JE, Wayne R, Castaneda G, Smith T. 2007. A recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage. *Proc. R. Soc. B* 274:2653–2660.
- Pérez-Tris, J, Bensch S, Carbonell R, Helbig AJ, Tellería JL. 2004. Historical diversification of migration patterns in a passerine bird. *Evolution* 58: 1819-1832.
- Peters, JL, Gretes W, Omland KE. 2005. Late Pleistocene divergent between eastern and western populations of wood ducks (*Aix sponsa*) inferred by the 'isolation with migration' coalescent method. *Mol. Ecol.* 14:3407–3418.
- Quinn, TW. 1992. The genetic legacy of mother goose: Phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen Caerulescens caerulescens* maternal lineages. *Mol. Ecol.* 1:105–117.
- Ruokonen, M, Kvist L. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Mol Phylogenet Evol* 23:422–432.
- Swofford, DL. 2002. PAUP_ Version 4.0b10: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24:1596-1599.
- Tarr, CL. 1995. Primers for amplification and determination of mitochondrial 367 control-region sequences in oscine passerines. *Mol. Ecol* 4:527–529
- Weir, JT, Schluter D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17: 2321–2328
- Walberg, MW, Clayton DA. 1981. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 9:5411–5421.
- Wenink, PW, Baker AJ, Tilanus MGJ. 1993. Hypervariable-control region sequences reveal global population structuring in a longdistance migrant shorebird, the Dunlin (*Calidris alpina*). *Proc Natl Acad Sci USA* 90:94–98
- Zink, RM, Blackwell RC. 1998. Molecular systematics and biogeography of aridland gnatcatchers (genus *Polioptila*) and evidence supporting species status of the California gnatcatcher (*Polioptila californica*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 9:26–32.

Zink, RM, Weckstein JD 2003. Recent evolutionary history of the fox sparrows (genus: *Passerella*). *Auk* 120:522–527.

CAPITULO 3

DIVERSIDAD GENÉTICA E HISTORIA DEMOGRÁFICA DEL GORRIÓN AMENAZADO Y ENDÉMICO *Spizella wortheni*

RESUMEN

El gorrión *Spizella wortheni*, endémico del Altiplano Mexicano, habita en áreas con una combinación de pastizal y matorral en el interior del noreste de México. Históricamente, esta especie se ha distribuido en 8 estados de la República Mexicana y Nuevo México EUA. Sin embargo, durante los últimos 30 años, sólo se ha reportado en un pequeño territorio que comprende la zona colindante entre los estados de Nuevo León, Coahuila y Zacatecas. Dado su limitado rango de distribución (25 km²), pequeño tamaño poblacional (100-120 individuos), y su declinante población (Birdlife internacional, 2010), se encuentra bajo protección como especie amenazada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059,-SEMARNAT-2001) y como en peligro de extinción en la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN 2010). Dado que el gorrión *S. wortheni* ha sufrido una contracción poblacional reciente, y el número de individuos estimados es muy bajo, se probó si ha pasado por un cuello de botella mediante el análisis de la región control hipervariable del ADNm. Además, debido a que la interpretación de los niveles de diversidad por sí mismos pueden ser difíciles, se comparó con otras especies de aves no amenazadas, relacionadas filogenéticamente (*S. breweri*, *S. atrogularis* y *S. passerina*) y ecológicamente (*A. bilineata*). Sorprendentemente se obtuvieron altos valores de diversidad y no se observaron señales de un cuello de botella mediante pruebas de neutralidad y coalescencia. Se discuten las posibilidades para mantener tan alta diversidad genética. A pesar de esto, es posible que esta alta diversidad genética pudiera ser transitoria y perderse en las futuras generaciones si no se aplica un plan de conservación para la especie y la población continúa decreciendo como hasta ahora. Por lo tanto, es urgente aplicar medidas de conservación para empezar a incrementar la población y así evitar que los efectos deletéreos de un cuello de botella más prolongado se empiecen a manifestar y pongan en riesgo la viabilidad de la especie.

3.1. INTRODUCCIÓN

El gorrión de Worthen (*Spizella wortheni*) endémico del Altiplano Mexicano es la única especie del género que no realiza movimientos migratorios. Habita en áreas con una combinación de pastizal y matorral en el interior del noreste de México. Históricamente, esta especie se ha distribuido en 8 estados de la República Mexicana; el último registro en Puebla fue en 1893, Tamaulipas en 1924, San Luis Potosí en 1951, Veracruz en 1957, Chihuahua en 1959 y Zacatecas en 1961 (Wege *et al.*, 1993). Sin embargo, durante los últimos 50 años, esta especie sólo se ha reportado en un pequeño territorio que comprende la zona colindante entre los estados de Nuevo León, Coahuila y Zacatecas. Su limitado rango de distribución (25 km²), pequeño tamaño poblacional (100-120 individuos), y su declinante población (Birdlife International, 2010) hacen de este gorrión una de las especies de aves más amenazadas en Norteamérica. Como consecuencia, se encuentra bajo protección como especie amenazada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059,-SEMARNAT-2001; SEMARNAT, 2002) y como en peligro de extinción en la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN, 2010). Se consideran a la agricultura y el sobrepastoreo sus principales amenazas (Wege *et al.*, 1993), sin embargo, factores intrínsecos a la especie no han sido estudiados.

Las especies en riesgo de extinción frecuentemente enfrentan múltiples amenazas. Por lo tanto, las valoraciones y planeación para su preservación son complejas y requieren diversos enfoques como la ecología, genética, biología de vida silvestre y de recursos naturales. En particular, existe la disciplina de la genética de la conservación, que trata con los factores genéticos que afectan el riesgo de extinción y con los regímenes de manejo requeridos para minimizar los riesgos (Frankham, 2002). El gorrión *S. wortheni*, al igual que otras especies amenazadas, afrontan múltiples peligros que incluye cambios medio ambientales, pequeño tamaño poblacional, estocasticidad ambiental, riesgo de endogamia y pérdida de diversidad genética. La endogamia puede afectar deletéreamente los rasgos asociados a la eficacia biológica, como la fecundidad y sobrevivencia, y por lo tanto incrementar el

riesgo de extinción (Frankham y Ralls, 1998). En general, las especies que marcadamente disminuyen en número se encuentran expuestas al efecto de cuello de botella y subsecuentemente al fundador, que en consecuencia producen una disminución de la diversidad genética (Futuyma, 1998; Frankham *et al.*, 2002). Por su parte, la variabilidad genética puede interactuar con los efectos demográficos para producir el “vórtice a la extinción de las pequeñas poblaciones” (Gilpin y Soulé, 1986). En particular, el ADN mitocondrial (ADNm) ha sido útil para trazar eventos de dispersión tempranos como cuellos de botella ó rápido crecimiento poblacional (Baker y Marshall, 1997; Weber *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007).

Dado que el gorrión *S. wortheni* ha sufrido una contracción poblacional en los últimos 50 años y el número de individuos estimados es muy bajo, se ha vuelto indispensable la determinación de la variabilidad genética en esta especie. En el presente trabajo se evalúa la diversidad genética de *S. wortheni* mediante la región control hipervariable del ADNm. Sin embargo, la interpretación de los niveles de diversidad por sí mismos pueden ser difíciles, pero comparándola con otras especies de aves relacionadas puede ser de gran ayuda en el contexto de historia de vida y similitudes ecológicas (Lawrence *et al.*, 2008; Kuro-o *et al.*, 2010; Bulgin *et al.*, 2003). Por tal motivo, se incluyeron en el análisis poblaciones de aves filogenéticamente cercanas (*S. breweri*, *S. atrogularis* y *S. passerina*) y/o que comparten el mismo entorno ecológico (*Amphispiza bilineata*).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Colecta y toma de muestras

Un total de 38 individuos de *S. wortheni* fueron capturados mediante redes de niebla, durante el periodo reproductivo e invernal entre los años 2005-2008, en localidades que abarcan gran parte de su rango actual (Figura 3.1). Los gorriones capturados fueron anillados con una combinación única de 3 anillos de colores para su identificación y monitoreo. Igualmente, se capturaron 10 individuos de *Amphispiza bilineata* durante el 2008 y 2009 en la localidad de San José del Alamito, Coah. Se colectaron 2 plumas por individuo, las cuales se almacenaron en sobres a temperatura ambiente durante la colecta y en congelación a largo plazo.

Se obtuvieron muestras de tejido muscular de *S. breweri* y *S. atrogularis*, 10 de cada uno, de la colección ornitológica del Museo de Historia Natural “Marjorie Barrick” de la Universidad de Nevada, Las Vegas (UNLV). Estos especímenes corresponden a poblaciones residentes del estado de Nevada, EU y fueron colectados durante el periodo reproductivo. También se incluyeron secuencias de la región control mitocondrial *S. passerina* del GenBank que corresponden a las poblaciones sedentarias del estado de Durango y Chihuahua, México (Milá *et al.*, 2006).

3.2.2. Extracción de ADN genómico y amplificación

El DNA genómico se obtuvo utilizando el KIT “DNAeasy Tissue Kit” siguiendo el protocolo de la casa comercial (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los fragmentos fueron amplificados en reacciones de 25 μ l bajo las siguientes condiciones estándar: desnaturalización a 94° C por 3 minutos, seguido de 36 ciclos de 94° C por 30 s, 48° C por 45 s y 72° C por 45 s. Seguido finalmente por una extensión de 72° C durante 10 minutos. El fragmento del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial fue amplificado con los oligonucleótidos H417 y LGL2 (Tarr, 1995).

Los productos amplificados fueron purificados utilizando el kit “Rapid PCR Purification System” (Marligen Biosciences Inc, Ijamsville, MD, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los fragmentos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos, utilizando los mismos oligonucleótidos con los cuales se amplificaron, en el Instituto de Biología (UNAM), en el laboratorio del Marjorie Barrick Musseum (University of Nevada, Las Vegas) ó por el servicio de secuenciación Macrogen USA (Rockville, Maryland). Las hebras complementarias de cada gen se alinearon usando el programa Sequencher 4.1 (GeneCodes). No se observaron inserciones o deleciones en las secuencias alineadas y todos los datos codificantes fueron traducidos en su forma aminoacídica utilizando el programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

3.2.3. Diversidad genética e historia demográfica

Los valores de polimorfismos y parámetros de diversidad genética fueron estimados con el programa Arlequin 3.11 (Schneider *et al.*, 2000). Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos fueron observadas mediante redes de distancia mínima absoluta, las cuales también se estimaron en el programa Arlequin 3.11

Para comprobar la hipótesis de expansión poblacional se aplicaron las pruebas de neutralidad F_u y D de *Tajima*. La primera detecta desviaciones de escenarios de neutralidad, valores negativos y significativos son señal de selección purificadora, caracterizados por el exceso de alelos extraños y mutaciones recientes y por lo tanto indicadores de expansión (Fu, 1997). Mientras que D de *Tajima*, cuantifica las discrepancias entre el estimado de Theta a partir de los sitios segregativos y entre el promedio de divergencia entre las comparaciones pareadas de las secuencias. Detecta desviaciones al modelo nulo de neutralidad, lo que puede ser causado por diversos factores, entre ellos, cambios en el tamaño poblacional (ej. una repentina expansión) ó que el locus se encuentre bajo una selección direccional. En ambos casos, esto provocaría un exceso de variantes de baja frecuencia y valores D negativos. Por el contrario, procesos como una subdivisión poblacional, selección balanceadora ó cuellos de botella recientes pueden causar un exceso en la frecuencia de variantes intermedias ocasionando valores D positivos (Tajima, 1993). Ambas

pruebas y su significancia fueron realizadas mediante 1,000 permutaciones al azar en el programa Arlequin 3.11.

Para probar si se podrían detectar señales de expansión repentinas en las poblaciones, se compararon las frecuencias observadas en la distribución de las diferencias de pares de secuencias entre los individuos (distribuciones *mismatch*; Rogers y Harpending, 1992) con las distribuciones esperadas de una población en expansión. Para ello, se generó una curva de distribución de expansión repentina mediante 1,000 replicaciones *bootstrap* (Excoffier *et al.*, 2005). En las poblaciones en equilibrio demográfico ó en declinación se observará una distribución multimodal en la diferencias pareadas, mientras que en las poblaciones que han sufrido una repentina expansión demográfica se obtendrá una filogenia tipo estrella y una distribución unimodal (Slatkin y Hudson, 1991; Rogers y Harpending, 1992). Para comparar las curvas observada de las simuladas se calcularon los valores de P como una proporción de las simulaciones produciendo una desviación mayor de la suma de cuadrados (SSD) que la SSD observada. El índice raggedness (r) de las distribución *mismatch* observada también fue calculada para cada una de las poblaciones y su significancia fue determinada de manera similar a SSD en Arlequin 3.11. Esta medida pretende cuantificar la uniformidad de las distribuciones observadas. Valores raggedness bajos son típicos de una población en expansión, mientras que valores altos son observados entre poblaciones estáticas ó en cuello de botella (Harpending *et al.*, 1993; Harpending, 1994). En ambos casos, si el valor de P es significativo, se rechaza la hipótesis nula de expansión.

Para estimar el tiempo desde que inició la expansión, se utilizó la formular $t = \tau/2ut$, donde t es el tiempo que ha pasado entre el tamaño inicial y el presente; tau (τ) es el número de los *mismatches* acumulados en tiempo mutacional desde la expansión medido en unidades de generaciones; $u = \mu k$, donde μ es la tasa de mutación, y k es la longitud de la secuencia (Rogers y Harpending, 1992). Los análisis fueron llevados cabo utilizando el programa Arlequin 3.11 (Schneider *et al.*, 2000).

Para estimar el tamaño de hembras efectivo se utilizó la formula $\theta = 2N_{ef} \mu$, donde N_{ef} es el tamaño de hembras efectivo y μ es la tasa de divergencia por locus por año) Para estimar el valor de Theta se realizó un análisis de coalescencia, mediante simulaciones de cadenas de Markov Metropolis-Hasting Monte Carlo, implementadas en el programa MDIV (Nielsen y Wakeley, 2001). El análisis

consistió de 10 cadenas cortas (con un incremento del muestreo de 10; 1,000 pasos por cadena), 20 cadenas largas (con un incremento en el muestreo de 10; 20,000 pasos) y un árbol inicial al azar con un valor de g inicial de 1 (g =tiempo generacional; en este caso, 1 año). Los valores de verosimilitud de θ fueron graficados y aquellos que tuvieron el máximo valor fueron aceptados como el mejor estimado.

Para escalar correctamente los valores de expansión demográfica y el tamaño de hembras efectivo, a valores biológicamente informativos, se requiere de una tasa de mutación neutral precisa. Motivo por el cual, en vez de utilizar la tasa empírica de sustitución de la región control previamente utilizada por Milá *et al.* (2006 y 2007) en *S. passerina*, de 0.1 hasta 0.3 sustituciones/sitio/millón de años, se aplicó una de 0.021 sustituciones/sitio/millón de años obtenida a partir de la tasa relativa de evolución entre la región control y el gen citocromo-*b* a diferentes escalas taxonómicas en la familia Emberizidae (Canales-del-Castillo, sin publicar; capítulo 2).

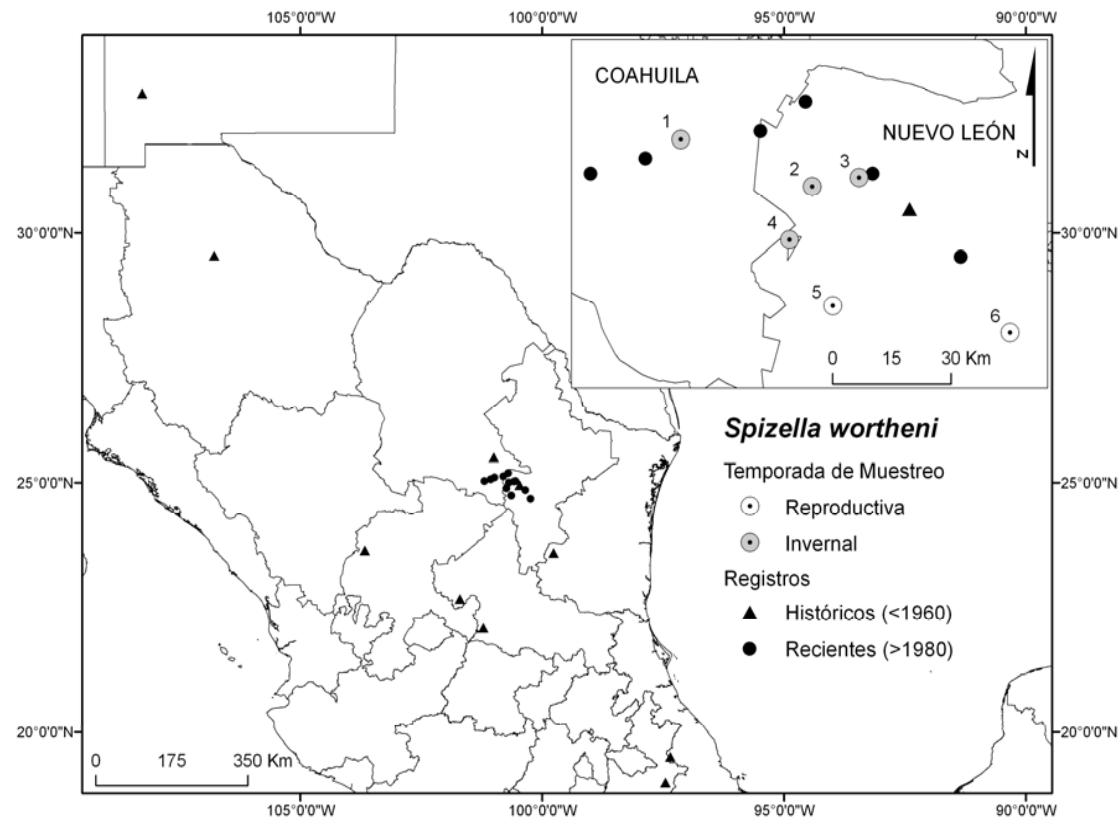


Figura 3.1 Registros históricos y recientes del gorrión *Spizella wortheni*. Históricamente esta especie tuvo una amplia distribución durante los últimos 30 años, esta especie solo se ha reportado en un pequeño territorio que comprende la zona colindante entre los estados de Nuevo León, y Coahuila. Las capturas durante el periodo invernal se realizaron en 1) Rancho Los Ángeles, 2) Erial, 3) San Rafael y 4) San José del Alamito, mientras que en época reproductiva en 5) Carbonera y 6) El Tokio.

3.3. RESULTADOS

En todos los especímenes de las poblaciones muestreadas se secuenció un fragmento de 328 pb de la región control mitocondrial. No se observaron inserciones ó deleciones. El número de sitios y las bases de los sitios polimórficos varió por especie (Apéndice C). El análisis de diversidad de los gorriones *S. wortheni* muestreados en invierno (n= 25) y verano (n=13) mostró números similares de haplotipos y de diversidad genética, por lo que se consideró como una sola población y en su conjunto se analizaron sus atributos. El mayor número de haplotipos identificados fue en la población de *S. wortheni* con 9, mientras que el menor fue en *S. breweri* con 6. Sin embargo, los mayores valores de diversidad genética y nucleotídica correspondieron a *S. atrogularis*, seguida por *S. wortheni* y el menor para la población sedentaria de Durango de *S. passerina* (Tabla 3.1).

El análisis de la red mínima de haplotipos, construida a partir de la distancia entre secuencia y su frecuencia, muestra que en *S. wortheni* predomina un haplotipo central, con varios derivados de él en menor frecuencia y algunos otros en la periferia, más escasos y por lo tanto recientes (Figura 3.2). Es importante señalar que la distancia entre uno y otro es en su mayoría de un sólo paso mutacional. Por el contrario, en *S. atrogularis* se observan haplotipos de igual frecuencia separados por varios pasos mutacionales, que podrían representar haplotipos que se han perdido. Ambas poblaciones de *S. passerina* comparten el haplotipo F, el central y más frecuente, además de poseer otro grupo diferente, haplotipos tipo E, que podrían ser consecuencia del contacto con otras poblaciones. En cambio *S. breweri* y *A. bilineata* tienen un haplotipo central y en alta frecuencia, del cual se derivan otros en menor frecuencia, y por lo tanto más recientes. Esta topología tipo estrella es típica en las poblaciones de expansión reciente.

En todas las secuencias de la región control de las poblaciones analizadas se observaron desviaciones negativas y significativas en las pruebas D de Tajima y/o Fu

a las expectativas de neutralidad. Solo las secuencias de *S. passerina* de Durango, México se desviaron positivamente, pero no significativamente. (Ver Tabla 3.2).

Tabla 3.1. Variabilidad genética de la región control mitocondrial en las poblaciones de gorriones.

Especie	Población	Hap.	H	π
<i>S. wortheni</i>	Invernal (n=25)	7	0.8033 ± 0.0496	0.004451 ± 0.003113
	Reproductiva (n=13)	6	0.8590 ± 0.0633	0.004221 ± 0.003115
	Invernal y reproductiva (n=38)	9	0.8080 ± 0.0371	0.004311 ± 0.002997
<i>S. atrogularis</i>	Reproductiva, NV (n=10)	6	0.8889 ± 0.0754	0.008469 ± 0.005525
<i>S. breweri</i>	Reproductiva, NV (n=10)	5	0.6667 ± 0.1633	0.003049 ± 0.002526
<i>S. passerina</i>	Sedentaria, Chih. (n=21)	7	0.6190 ± 0.118	0.004036 ± 0.00291
<i>S. passerina</i>	Sedentaria, Dgo. (n=20)	6	0.5737 ± 0.1219	0.003578 ± 0.002681
<i>A. bilineata</i>	Sedentaria, N.L. León (n=10)	6	0.7778 ± 0.1374	0.003049 ± 0.002526

H. Valor de diversidad haplotípica ± error estándar.

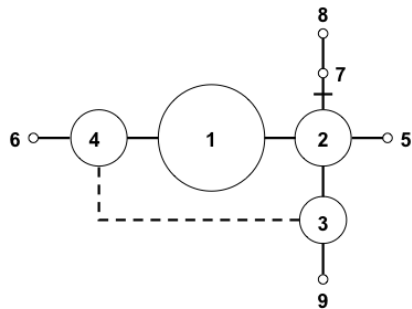
π . Valor de diversidad nucleotídica ± error estándar.

Los análisis de distribución *mismatch* indicaron que en las poblaciones de *S. wortheni*, *S. breweri* y *A. bilineata* se recuperaron señales genéticas de una repentina expansión (Figura 3.3). A pesar de que en las poblaciones de *S. atrogularis* y *S. passerina* se obtuvieron curvas multimodales, solo en la población de Durango se rechazó la hipótesis de una expansión (SSD= 0.43, $p=0.001$, Figura 3.2). Con base en los promedios de *mismatch* (tau) se calculó que el tiempo en que pudo haber tenido lugar la expansión de *S. wortheni* fue entre 78,000 y 277,000 años (Tabla 3.2). Sin

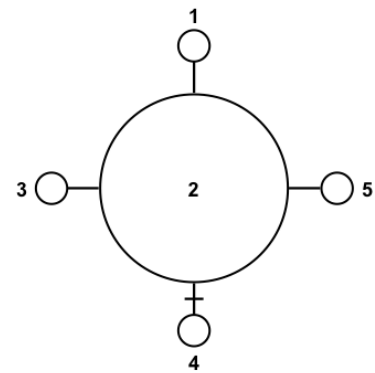
embargo, los valores mayores corresponden a *S. atrogularis* y *S. passerina* Chihuahua, que presentan intervalos de confianza muy altos, volviendo impreciso estas estimaciones.

El tamaño de hembras efectivo poblacional en *S. wortheni* fue calculado a partir del valor de θ , el cual fue similar en todas las poblaciones (Figura 3.4). El rango calculado del tamaño efectivo de hembras poblacional para *S. wortheni* fue de 100,000 mientras que el resto de las poblaciones presentaron un rango entre 83,000 y 136,000.

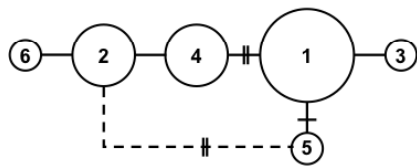
S. wortheni
NL, Mex.



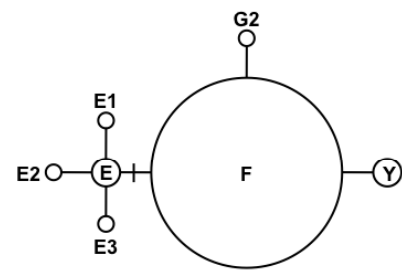
S. breweri
Nevada, EU.



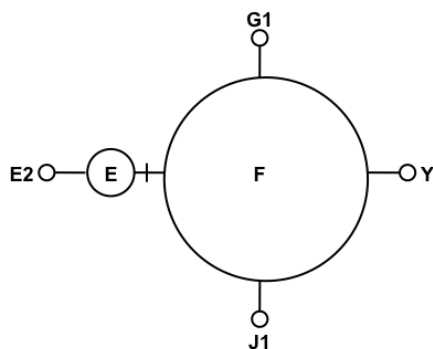
S. atrogularis
Nevada, EU.



S. passerina
Chihuahua, Mex.



S. passerina
Durango, Mex.



A. bilineata
NL, Mex.

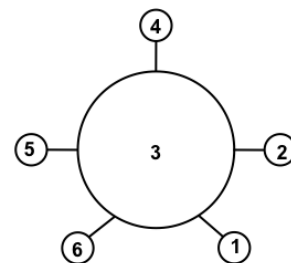


Figura 3.2 Redes de haplotipos de las secuencias del dominio hipervariable de la región control mitocondrial. Los haplotipos son mostrados como círculos que son proporcionales a la frecuencia de las muestras analizadas. Las redes representan una sustitución nucleotídica mientras que las marcas a lo largo de las ramas señalan sustituciones adicionales. Las líneas punteadas muestran redes alternativas de igual verosimilitud.

Tabla 3.2. Índices y tiempos de expansión poblacional.

Especie	<i>Tajima</i>	<i>F_s</i>	<i>Tau</i> (95% C.I.)	Índice raggedness <i>r</i>	Tiempo desde el inicio de la expansión (años)	<i>N_{ef}</i>
<i>S. wortheni</i>	-0.7420 (0.262)	-3.0927 (0.046)	1.564 (0.318-2.877)	0.0083 (0.11)	114,000	100,000
<i>S. atrogularis</i>	0.5193 (0.695)	-1.0019 (0.206)	3.809 (0.400-7.910)	0.1051 (0.35)	277,000	92,000
<i>S. breweri</i>	-1.7411 (0.026)	-2.2597 (0.004)	1.074 (0.00-2.328)	0.0666 (0.809)	78,000	136,000
<i>S. passerina</i> Chihuahua, Mex.	-1.0362 (0.171)	-2.4295 (0.041)	3.217 (0.00-6.215)	0.0678 (0.83)	234,000	85,000
<i>S. passerina</i> Durango, Mex	-1.1736 (0.100)	-1.7794 (0.089)	0 (0.00-0.709)	0.1267 (1.0)	-	83,000
<i>A. bilineata</i>	-1.7411 (0.032)	-3.8769 (0.001)	1.273 (0.00-1.781)	0.2716 (0.15)	93,000	93,000

τ . Estadístico de la distribución *mismatch*.

r. Índice *raggedness* de la distribución *mismatch*, con su valor de significancia *P* entre paréntesis y en negritas cuando menor de 0.05.

Tajima. Índice de la prueba de Tajima, con su valor de significancia *P* entre paréntesis y en negritas cuando menor de 0.05.

F_s. Valor de la prueba de neutralidad de Fu, con su valor de significancia *P* entre paréntesis y en negritas cuando menor de .05

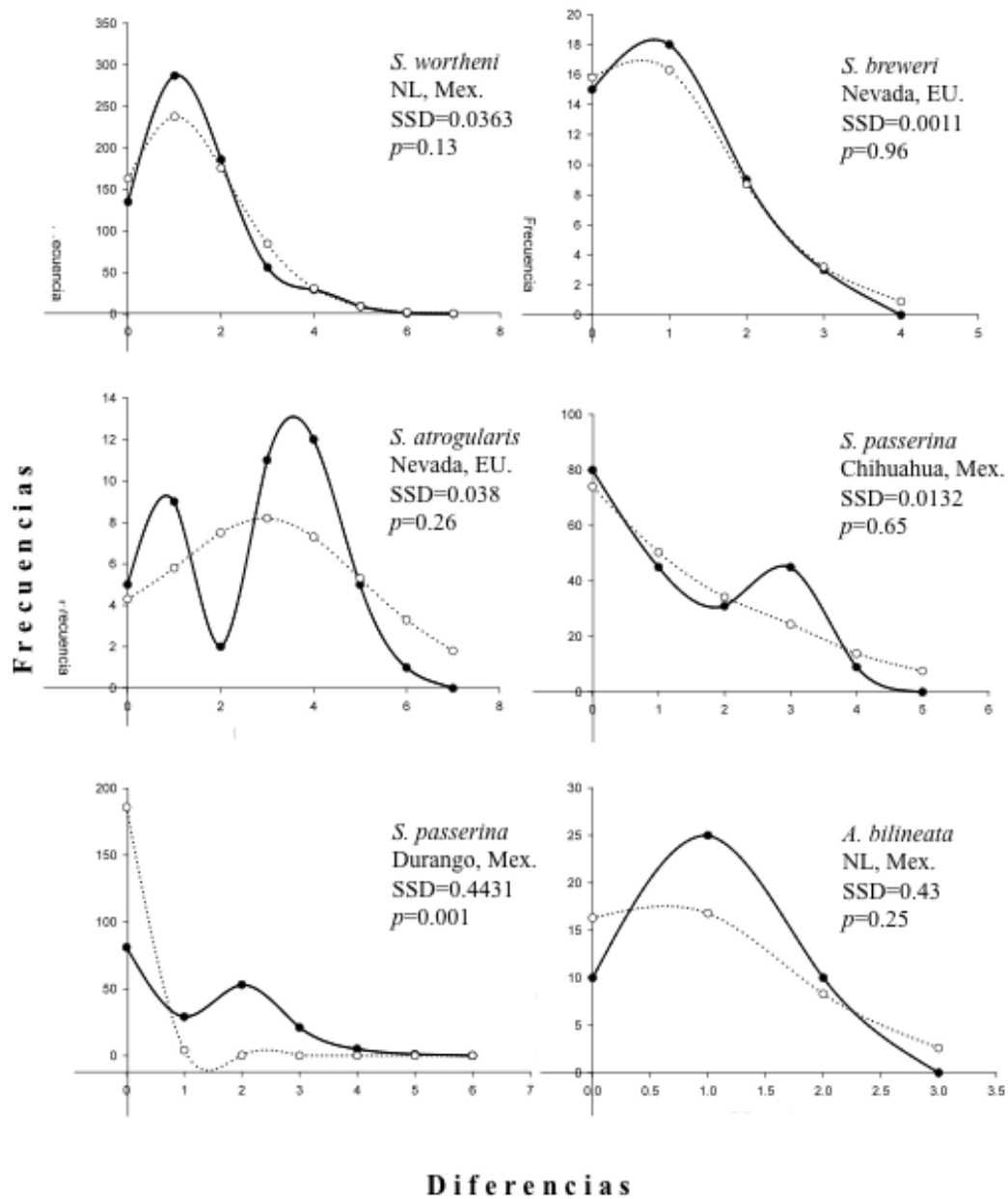


Figura 3.3. Distribución *mismatch* para todas las poblaciones. Las líneas sólidas representan los valores observados y las líneas punteadas los esperados bajo un modelo de expansión. Se muestra el valor p de la prueba SSD que indica el ajuste al modelo de expansión.

Figura 3.4. Distribuciones posteriores de θ estimada en las poblaciones de gorriones mediante el programa MDIV. En cada uno se indica el valor de θ con la máxima probabilidad.

3.4. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados de variabilidad genética, *S. wortheni* aún retiene una gran diversidad a pesar de la declinación poblacional que ha sufrido durante los últimos 50 años (Wege *et al.*, 1993). Esto es evidente cuando se comparan los valores de variabilidad, que fueron similares ó superiores, con otras especies filogenéticamente cercanas (*S. breweri*, *S. atrogulatis* y *S. passerina*) o simpátricas (*A. bilineata*), con mayores rangos de distribución y que no se encuentran amenazadas. Asimismo, las relaciones entre haplotipos, visualizadas mediante una red mínima, muestran que no se han perdido haplotipos intermedios, lo que sugiere una estabilidad poblacional. Eso es sorprendente debido a que generalmente las especies en peligro muestran una baja diversidad genética (Arden y Lambert, 1997; Spielman *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha observado que ciertas especies amenazadas tras un cuello de botella, han persistido en mantener su diversidad genética, ya sea porque poseían una alta diversidad antes de la declinación (Kuro-o *et al.*, 2010), por su amplia distribución histórica y un gran tamaño poblacional en el pasado (Balakrishnan *et al.*, 2003) ó porque la duración del cuello ha sido corta y reciente y no ha sido posible detectarla (Bulgin *et al.*, 2003).

La información sobre la distribución histórica de *S. wortheni* es escasa; es a partir de 1854 cuando se describe la especie en Nuevo México (Ridgway, 1884) y en 1893 cuando se reporta por primera vez en México en el estado de Puebla (Ridgway, 1901). Siendo éstos los registros extremos de su distribución histórica conocida. Sin embargo, el hábitat potencial se encuentra distribuido en todo el desierto Chihuahuense, y zonas áridas de la Península de Baja California y Oaxaca (BirdLife International, 2010). Con base en lo anterior, la especie pudo haber tenido una mayor distribución en el pasado y haber empezado a sufrir una contracción gradual desde antes de su descripción, siendo ésta más severa desde la mitad del siglo XX en donde los registros comenzaron a ser más escasos (Wege *et al.*, 1993), de esta manera pudo haber conservado parte de la diversidad genética del pasado. Asimismo, la población actual puede estar localizada cercana al centro de origen de la especie, donde

usualmente se presenta una mayor diversidad genética, como en el caso de *S. passerina* que hacia el sur de México y Centroamérica presenta los más altos valores de diversidad genética comparados con los del norte de México, poblaciones más recientes y menos diversas (Milá *et al.*, 2006). El hecho de que la población remanente se encuentre cerca del centro hipotético de su distribución histórica, le habría permitido estar mejor conectada y con mayor flujo genético, contrario al fenómeno que experimentan las poblaciones fragmentadas ó metapoblaciones que son más susceptibles de la extinción debido a procesos estocásticos ó genéticos (Ortego *et al.*, 2008). Un análisis genético con las muestras históricas de museo de las ahora extirpadas poblaciones podría comprobar esta hipótesis.

La alta diversidad genética observada en el gorrión *S. wortheni* también podría deberse a que esta especie tuvo en el pasado un gran tamaño poblacional. El tamaño histórico de la población no se conoce, aunque en los primeros estudios iniciados a mediados del siglo pasado la densidad ya era baja, lo que hacía pensar en que era una especie poco común (Webster, 1954, 1958; Wege *et al.*, 1993), probablemente porque ya había entrado en contracción. Actualmente, su tamaño poblacional está calculado entre 100-120 individuos (BirdLife International, 2010) y 200 de acuerdo a nuestro censo reproductivo (Canales-del-Castillo *et al.*, datos sin publicar). En cambio, el tamaño efectivo poblacional de hembras calculado es de alrededor de 100,000 (el doble para estimar la población total), similar en magnitud para los otros gorriones. Este valor representa el tamaño efectivo poblacional a largo plazo e indica que el gorrión alguna vez fue abundante, lo que en consecuencia le ha permitido mantener los altos niveles de diversidad a pesar de la disminución actual. Esto se ha visto en otras especies en peligro con un bajo tamaño poblacional actual pero con una alta diversidad genética (Balakrishna *et al.*, 2003; Bulgin *et al.*, 2003).

Por otra parte, algunos autores consideran que no es posible detectar señales de declinación poblacional recientes usando pruebas de neutralidad y expansión debido al umbral de detectabilidad, el retraso en el tiempo ó eventos demográficos antiguos que podrían enmascarar a los recientes (Rogers y Harpending, 1992; Lavery *et al.*, 1996). Sin embargo, recientemente se demostró lo contrario mediante un análisis con el urogallo *Tympanuchus cupido*, especie en peligro de extinción, utilizándose muestras históricas previas a un severo cuello de botella (hace 100 y 50 años) y actuales. En las muestras históricas se observaron curvas unimodales y no se rechazó las hipótesis de expansión mientras que en las actuales se observaron curvas

multimodales y se rechazó el modelo de una repentina expansión ocurrida en el Pleistoceno Tardío. Demostrándose así, que las señales de una reciente declinación poblacional puede ser detectadas utilizando distribuciones *mismatch* y no necesariamente ser enmascaradas por eventos demográficos tempranos (Weber *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007). En el caso del gorrión *S. wortheni*, a pesar de su situación crítica, aún fue posible observar señales de expansión histórica similares a *S. breweri* y *A. bilineata*; quienes presentaron desviaciones negativas y significativas del modelo de neutralidad (Tabla 3.2), curvas unimodales y no rechazaron el modelo de expansión (Figura 3.3). El rango de años calculados para la expansión de estas poblaciones es entre 78,000 y 114,000 años, que corresponde al periodo de Pleistoceno tardío y a la glaciación temprana Winsconsin. Evidencia de una reciente expansión poblacional es común entre las aves del hemisferio norte y generalmente se interpreta como una expansión postglacial a partir de refugios en la glaciación Winsconsin tardía (Milá *et al.*, 2006; Milá *et al.*, 2007). Sin embargo, la diferencia entre estas estimaciones se podría deber al uso de una tasa de evolución sobreestimada empíricamente de la región control y no calibrada con un gen codificante. Las poblaciones de *S. passerina* de Chihuahua y *S. atrogularis* tuvieron un tiempo de expansión más antiguo, pero presentan intervalos de confianza muy altos, volviendo imprecisas estas estimaciones. De esta manera, la posibilidad de detectar las señales de expansión en *S. wortheni* y que estas sean similares a los otros gorriones con poblaciones saludables nos indican que la alta diversidad observada se ha mantenido y que la presión del cuello de botella no ha sido tan fuerte para empezar a disminuir su diversidad genética.

A pesar de que no se detectó una pérdida de diversidad genética producto de la contracción histórica en estas generaciones, es posible que esta alta diversidad genética pudiera ser transitoria y no poderse observar en las futuras generaciones si no se aplica un plan de conservación para la especie y la población continúa decreciendo como hasta ahora. Lo anterior se ha observado en un ave marina en peligro de extinción, *Pterodroma magna*, en cuya próxima generación, sólo se observará la mitad de los haplotipos históricos que aún mantienen los padres (Lawrence *et al.*, 2008). Por lo tanto, es urgente aplicar medidas de conservación para empezar a incrementar la población y así evitar que los efectos deletéreos de un cuello de botella más prolongado se empiecen a manifestar y pongan en riesgo la viabilidad de la especie.

LITERATURA CITADA

- Ardern, SL, Lambert DM. 1997. Is the Black Robin in genetic peril? *Mol Ecol* 6:21-28.
- Balakrishnan, CN, Monfort SL, Gaur A, Singh L, Sorenson MD. 2003. Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). *Molecular Ecology* 12:1-10.
- Baker, AJ, Marshall HD. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: Mindell, D.P. (Ed.), *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academia Press, San Diego, pp. 51-82.
- BirdLife International. 2010. Species factsheet: *Spizella wortheni*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 27/9/2010.
- Bulgin, NL, Gibbs HL, Vickery P, Baker AJ. 2003. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Molecular Ecology* 12:831-844.
- Excoffier, L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3. 0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Frankham, R. y Ralls, K. 1998. Conservation biology: Inbreeding leads to extinction. *Nature* 392:441-442.
- Frankham, R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 12-23.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical neutrality of mutations against population growth, growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.
- Futuyma, DJ. 1998. *Evolutionary biology*, 3rd edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Gilpin, ME, Soulé ME. 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. In M. Soule, ed. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. pp 19-34.

- Harpending, H. 1994. Signatura of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA *mismatch* distribution. *Hum. Biol.* 66:591-600.
- IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 02 September 2010.
- Johnson, JA, Dunn PO, Bouzat JL. 2007. Effects of recent population bottlenecks on reconstructing the demographic history of prairiechickens. *Molecular Ecology* 16: 2203–2222.
- Kuro-o, M, Yonekawa H, Saito S, Eda M, Higuchi H, Koike H, Hasegawa H. 2010. Unexpectedly high genetic diversity of mtDNA control region through severe bottleneck in vulnerable albatross *Phoebastria albatrus*. *Conserv. Genet.* 11:127–137.
- Lavery, S, Moritz C, Fielder DR. 1996. Indo-PaciWc population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro*. *Mol Ecol* 5:557–570
- Lawrence, HA, Taylor GA, Millar CD, Lambert DM. 2008. High mitochondrial and nuclear genetic diversity in one of the world's most endangered seabirds, the Chatham Island taiko (*Pterodroma magentae*). *Conserv Genet* 9:1293–1301
- Nielsen, R, Wakeley J. 2001. Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, 158, 885–896.
- Milá, B, Smith TB, Wayne RK. 2006. Postglacial population expansion drives the evolution of long-distance migration in a songbird. *Evolution* 60:2403–2409.
- Milá, B, McCormack JE, Wayne R, Castaneda G, Smith T. 2007. A recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage. *Proc. R. Soc. B* 274:2653–2660.
- Ortego, J, Aparicio JM, Cordero PJ, Calabuig G. 2008. Individual genetic diversity correlates with the size and spatial isolation of natal colonies in a bird metapopulation. *Proc R Soc Lond B* 275:2039-2047.
- Ridgway, R. 1884. Description of a new species of Field-Sparrow from New Mexico. *Proc. U. S. Nat. Muse.* 7:259.
- Ridgway, R. 1901. *Birds of North and Middle America*. U. S. National Museum Bull. 50:1.

- Rogers, AR, Harpending H. 1992 Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic divergences. *Mol Biol Evol* 9:552–569
- Schneider, S, Keuffer JM, Roessli D, Excoffier L. 2000. ARLEQUIN, Version 2.000: a software package for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2001. 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. Secretaría de Gobernación, México, D. F. Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo de 2002. Available on: <http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/Normas Oficiales Mexicanas vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf>
- Slatkin, M, and Hudson RR. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 123: 585-595.
- Spielman, D, Brook BW, Frankham R. 2004 Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15261-15264.
- Tajima, F. 1993. Measurements of DNA polymorphism. In Takahata, N. and Clark, AG. (eds), *Mechanism of Molecular Evolution*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, pp. 37-59.
- Tamura, K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599.
- Tarr, CL. 1995. Primers for amplification and determination of mitochondrial 367 control-region sequences in oscine passerines. *Mol. Ecol* 4:527–529
- Weber, DS, Stewart BS, Lehman N. 2004. Genetic consequences of a severe population bottleneck in the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*). *Journal of Heredity*, 95:144–153.
- Webster, JD, Orr RT. 1954. Summering birds of Zacatecas, Mexico, with a description of a new race of Worthen's Sparrow. *Condor* 56:155-160.
- Webster, JD. 1958. Further ornithological notes from Zacatecas, Mexico. *Wilson Bulletin* 70:243-256.

Wege, DC, Howell SNG, Sada, AM. 1993. The distribution and status of Worthen's Sparrow *Spizella wortheni*: a review. Bird Conservation International 3:211-220.

CAPITULO 4

ÉXITO REPRODUCTIVO Y NUEVOS SITIOS DE ANIDACIÓN DEL GORRIÓN
Spizella wortheni.

RESUMEN

El gorrión *Spizella wortheni* es una especie endémica del Altiplano Mexicano y ha sido enlistada como en peligro de extinción. La biología reproductiva de este gorrión es pobremente comprendida, y sólo existen tres sitios donde está comprobado que anida actualmente (Las Esperanzas, Nuevo León, y La India y Tanque de Emergencia, Coahuila). Durante los meses de junio a julio del 2006-2007 se buscó actividad reproductiva de *S. wortheni* y se confirmaron tres nuevas localidades con nidos: La Carbonera ($n=33$ nidos) y San Rafael ($n=2$) en el estado de Nuevo León, y San José del Alamito ($n=3$) en el estado de Coahuila. De un total de 38 nidos encontrados durante los periodos reproductivos del 2006-2007, la mayor parte de ellos fueron colocados en el arbusto *Flourensia cernua*, seguido por *Opuntia sp.*, *O. imbricata*, y *Lycium sp.* En general, los nidos fueron construidos a una altura baja (20.06 ± 10.14 cm; $n=24$). Los parámetros y éxito reproductivo se estimaron a partir de 33 nidos monitoreados en La Carbonera. El tamaño de nidada fue de entre 2 y 4 huevos, siendo el promedio de la puesta de 3.22 ± 0.57 huevos. El 3.03% ($n=1$) fue destruido durante la construcción, el 53.63% ($n=21$) depredado durante la puesta y el 33.33% ($n=11$) durante el cuidado parental. El porcentaje de infertilidad fue del 16.6% ($n=9$). Ningún nido fue exitoso. La estimación mediante Mayfield de la probabilidad de éxito para todo el periodo fue de 9.56% (3.87-22.79%). La principal causa del fracaso reproductivo fue la depredación. La conversión de la tierra a agricultura es la mayor amenaza a los pastizales en el noreste de México y por lo tanto esfuerzos de conservación deben de ser implementados para proteger las áreas reproductivas del gorrión *S. wortheni*.

4.1. INTRODUCCIÓN

Las especies en peligro de extinción, por definición tienen un tamaño poblacional pequeño, por lo que de manera inmediata es necesario incrementarlo tan rápido como sea posible, enfocándose el manejo a identificar los parámetros ambientales (e.g. destrucción y degradación del hábitat) y demográficos (baja reproducción y poca supervivencia) que amenazan la población. Por lo tanto, el manejo parte del grado de conocimiento de la biología del ave y, en ese sentido, el gorrión *S. wortheni* es una especie poco estudiada. Si bien es cierto que el gorrión *S. wortheni* se distribuye en los pastizales, uno de los ecosistemas más amenazados a nivel mundial debido principalmente a la agricultura y la fragmentación, poco se sabe de otras amenazas directas a este gorrión.

El gorrión *S. wortheni*, es una especie endémica al Altiplano Mexicano, que se encuentra protegida por las leyes mexicanas como amenazada (NOM-059-SEMARNAT-2001; SEMARNAT, 2002) y enlistada como en peligro de extinción en la Lista Roja de Especies Amenazadas debido a su limitado rango (25 km²) y pequeño tamaño poblacional (BirdLife International, 2010). Durante los últimos 30 años, esta especie sólo se ha observado, ya sea anidando o formando parvadas invernales, en una pequeña área entre los estados de Nuevo León y Coahuila (Wege *et al.*, 1993; Behrstock *et al.*, 1997; Garza-de León *et al.*, 2007; Scott-Morales *et al.*, 2008).

Previamente se había generado información básica acerca de su distribución, uso de hábitat y biología reproductiva (Thayer, 1925; Webster, 1954, Wege *et al.*, 1993). Mientras que en trabajos más recientes se han enfocado en los registros reproductivos y descripciones de uso de hábitat (Behrstock *et al.*, 1997; Canales-Delgadillo *et al.*, 2007; Scott-Morales *et al.*, 2008), comportamiento de parvadas (Canales-Delgadillo *et al.*, 2008) y en el éxito reproductivo (Garza-de León *et al.*, 2007).

En años recientes, la anidación de *S. wortheni* sólo se ha confirmado en tres áreas: 1) Las Esperanzas, Nuevo León (Behrstock *et al.*, 1997), donde dos nidos se

observaron y el hábitat aledaño fue caracterizado; 2) La India, Coahuila (Garza-de León *et al.*, 2007), donde siete nidos fueron encontrados y se estimó el éxito reproductivo en un 14%; y 3) Tanque de Emergencia, Coahuila, donde sólo un nido activo fue encontrado (Canales-Delgadillo *et al.*, 2007). Sin embargo, existen otros posibles sitios como La Paz y Los Pocitos, Nuevo León, en donde algunos individuos fueron colectados y se grabaron llamados en los años 1959 y 1981, respectivamente (Wege *et al.*, 1993), y El Guerrero, Nuevo León donde se observaron machos cantando y a una pareja llevando comida (Scott-Morales *et al.*, 2008; Figura 4.1).

En una revisión acerca del estatus y distribución de *S. wortheni*, Wege *et al.* (1993) concluyeron que se encuentra restringido a zonas con mezquite (*Prosopis*) o pastizales de *Yucca-Juniperus*, basado en la co-ocurrencia en tres localidades: 1) el área de Miquihuanan en Tamaulipas, descrita como pie de montaña con arbustos espinosos (Thayer, 1925); 2) el área de Sombrerete, en Zacatecas, descrita como pastizal bajo con mezquite y junípero (Webster, 1954); y 3) el área de Tanque de Emergencia-El Cercado, descrito como pastizal de *Yucca-Juniperus* (Wege *et al.*, 1993). Sin embargo, las observaciones más recientes se han realizado en áreas de matorral desértico asociado con pastizal. Por ejemplo, Behrstock *et al.*, (1997) reportaron al gorrión en Las Esperanzas, Nuevo León, un área dominada por el arbusto chamizo (*Atriplex canescens*) y pastos (principalmente *Hilaria mutica* y *Bouteloua sp.*). Asimismo, Garza-de León *et al.*, (2007) describió a La India como un sitio reproductivo conformado por un fragmento de 9 ha de matorral desértico micrófilo rodeado de una matriz pastizal. El estrato arbustivo estaba dominado por el hojásén (*Flourensia cernua*), con algunas hierbas y pastos en su estrato herbáceo. Finalmente, el hábitat circundante a un solo nido activo en Tanque de Emergencia-El Cercado consistió en parches de *Condalia* y *Juniperus* adyacentes a pastizales (Canales-Delgadillo *et al.*, 2007).

Dado el grado de amenaza del gorrión *S. wortheni*, la conservación de esta especie bien podría depender en la identificación, protección y restauración de áreas de anidación donde el éxito reproductivo sea suficiente para mantener la población. Al momento sólo se conocen pocos sitios reproductivos y sólo en uno se ha determinado el éxito reproductivo, por lo cual los objetivos principales de este trabajo fueron buscar nuevos sitios de anidación y estimar su éxito reproductivo.

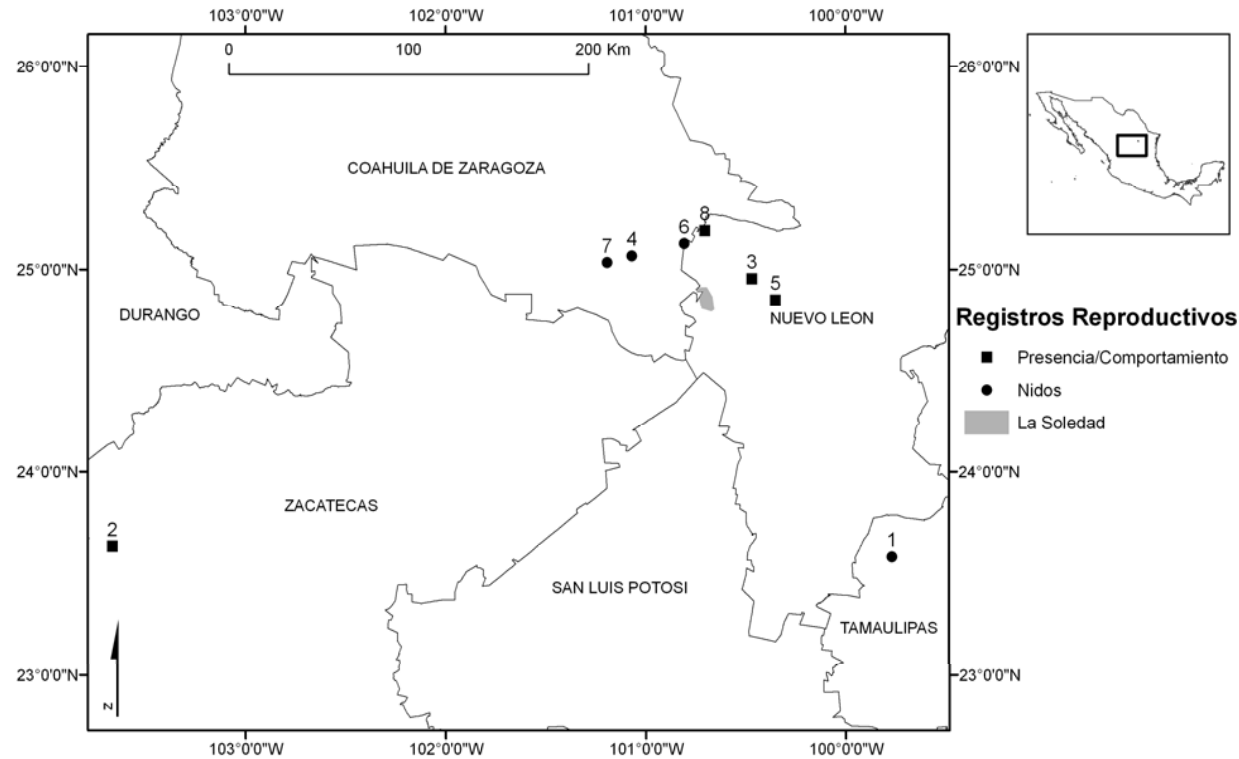


Figura 4.1 Registros reproductivos históricos del gorrion *S. wortheni* basados en su presencia, comportamiento o nidos. 1) Miquihuana, Tamaulipas (Thayer, 1925), 2) Sombrerete, Zacatecas (Webster y Orr 1954, Webster 1954, 1958), 3) La Paz (Wege *et al.*, 1993), 4) Tanque de Emergencia (Wege *et al.*, 1993; Canales-Delgadillo *et al.*, 2007), 5) Los Pocitos (Wege *et al.*, 1993), 6) Las Esperanzas, Nuevo León (Behrstock *et al.*, 1997), 7) La India, Coahuila (Garza-de León *et al.*, 2007) y 8) El Guerrero, Nuevo León (Scott-Morales *et al.*, 2008).

4.2. MÉTODOS

El área de estudio se localiza al sur de la Ecorregión del Desierto Chihuahuense entre los límites de los municipios de Saltillo, Coah. y Galeana, NL, donde en los últimos 30 años se han tenido registros del gorrión *S. wortheni*. (Figura 4.1). Debido a que el factor común entre los sitios reproductivos descritos previamente, es la presencia de pastizal asociado con arbustos, se procedió a buscar al gorrión en la mayor y continua área de pastizal en el noreste de México, La Soledad (cerca de 10, 000 ha) en el municipio de Galeana Nuevo León y sus alrededores.

Durante la temporada reproductiva del 2006, del 23 de junio al 12 de julio, se procedió únicamente a la búsqueda de actividad reproductiva y registro de nuevos sitios de anidación. Mientras que en el 2007 se buscó confirmar la actividad reproductiva del 2006 y se llevó a cabo la búsqueda de nidos y monitoreo, que se extendió del 9 de junio al 20 de julio. Se consideró un sitio como reproductivo cuando se localizaron nidos o se observaron pistas de comportamiento de los padres tales como; material de construcción de nidos ó alimento en el pico y machos cantando. Una vez localizados los nidos, estos fueron geo-referenciados con la ayuda de GPS Garmin con una precisión de 4 m. El monitoreo de nidos se llevó a cabo cada 3 ó 4 días durante la mañana o la tarde, siguiendo las recomendaciones de Martín y Guepel (1993). Los datos tomados fueron: especie del arbusto soporte, progreso de la construcción del nido, estado del nido, número de huevos, día de la eclosión de los huevos, día de abandono del nido (volantones) y en el caso de ser fallidos se trató de determinar la causa.

La estimación de la productividad se llevó a cabo mediante los siguientes parámetros: número de huevos puestos, número de huevos eclosionados y el número de volantones que dejaron el nido. Los porcentajes de éxito aparente se calcularon de la siguiente manera: El éxito de eclosión de obtuvo dividiendo el número total de huevos eclosionados entre el número total de huevos puestos, mientras que el éxito

de emancipación se obtuvo dividiendo el número de pollos que dejaron el nido entre el total de huevos eclosionados.

Una vez obtenidos los registros de las observaciones de los nidos, estos fueron analizados con el programa Mayfield (Bart y Robson, 1982) para estimar la probabilidad de supervivencia diaria (psd) e intervalos de confianza (95%). Este método evita la sobrestimación del éxito reproductivo y se basa principalmente en los días de exposición de los huevos o pollos por lo que no es necesario encontrar los nidos desde el comienzo de la temporada (Apéndice D). Los valores de probabilidad de éxito reproductivo (\pm 95% IC) se calcularon para todo el periodo (22 días), y por etapas: incubación (14 días, con base en las observaciones realizadas en campo) y cuidado parental (8 días; Garza-de León *et al.* 2007). Los cálculos se obtuvieron elevando la probabilidad de supervivencia diaria a la duración de cada período analizado en días.

4.3. RESULTADOS

Los sitios donde se registró actividad reproductiva fueron los ejidos San Rafael, Carbonera, y el Rancho El Compromiso, Municipio de Galeana, en el estado de Nuevo León, y San José del Alamito en el municipio de Saltillo, en el estado de Coahuila. En general, la vegetación está constituida principalmente por fragmentos de matorral desértico de *Flourensia cernua* y *Atriplex canescens* incluidos dentro de una matriz de pastizal bajo abierto gipsófilo asociados a herbáceas anuales y perennes (Figura 4.2). La localidad de San Rafael se encuentra cercada y bajo la protección de la asociación civil PRONATURA Noreste desde el 2006. Mientras que Carbonera se ha aprovechado con fines de pastoreo de ganado por los ejidatarios bajo los acuerdos firmados en el usufructo con PRONATURA para la protección del perrito llanero mexicano (*Cynomys mexicanus*). Sin embargo, durante el periodo de estudio se llegaron a contabilizar hasta un centenar de vacas. Por su parte, en El Rancho “El Compromiso”, adyacente al ejido Carbonera, no se observó ganado en el sitio de anidación del gorrión debido a su manejo ganadero. En cambio, el Ejido San José del Alamito utiliza sus predios para el pastoreo de ganado caprino sin que esté sujeto a ningún esquema de manejo.

4.3.1. Actividad reproductiva 2006

San Rafael, Nuevo León. El 23 de junio se encontró un nido abandonado con dos huevos y una pareja con dos juveniles cercanos a un nido abandonado localizado en *Lycium berlandieri*.

La Carbonera, Nuevo León. El 11 de julio se localizaron 3 nidos: (1) un nido en construcción localizado entre dos plantas, *Opuntia engelmannii* y *F. cernua*; (2) un nido con 3 huevos en *O. engelmannii*; y (3) un nido con dos huevos a lado del camino en un arbusto de *F. cernua*. Durante el mismo día se localizó un nido del gorrión *Amphispiza bilineata* con cuatro huevos (completamente blancos). Debido a

que el nido en apariencia es igual al de *S. wortheni*, cuatro nidos inactivos en el área no pudieron ser identificados por especie.

San José del Alamito, Coahuila. El 23 de Junio se localizó un nido con un huevo construido entre dos plantas, *O. imbricata* y *F. cernua*. El 11 de julio se encontraron dos nidos en *F. cernua*: uno con 3 pollos y el otro nido abandonado con dos huevos decolorados por el sol.

4.3.2. Actividad reproductiva 2007

San Rafael, Nuevo León. Durante visitas diarias realizadas los días 11 al 16 de junio se avistaron sólo dos parejas, una de ellas trasladando alimento, pero no fue posible localizar los nidos.

San José del Alamito, Coahuila. Durante las visitas realizadas al predio de los días 9 y 20 de junio del 2007 se observaron 8 machos cantando. No se encontraron nidos.

Rancho El Compromiso, Nuevo León. Los días 10, 11, 12, 18 y 30 junio se visitó el sitio y se encontró un nido con cuatro pollos, cuatro parejas, dos nidos abandonados, tres machos cantando y una pareja con un volantón que fue monitoreado durante dos días y se consideró exitoso.

La Carbonera, Nuevo León. En esta área se encontró la mayor actividad reproductiva con 33 nidos de *S. wortheni* y seis de *A. bilineata* (Figura 4.2). La mayoría de los nidos fueron localizados en *F. cernua* ($n=24$), seguido por *Opuntia* sp. ($n=6$) y finalmente *Lycium* sp. ($n=2$).

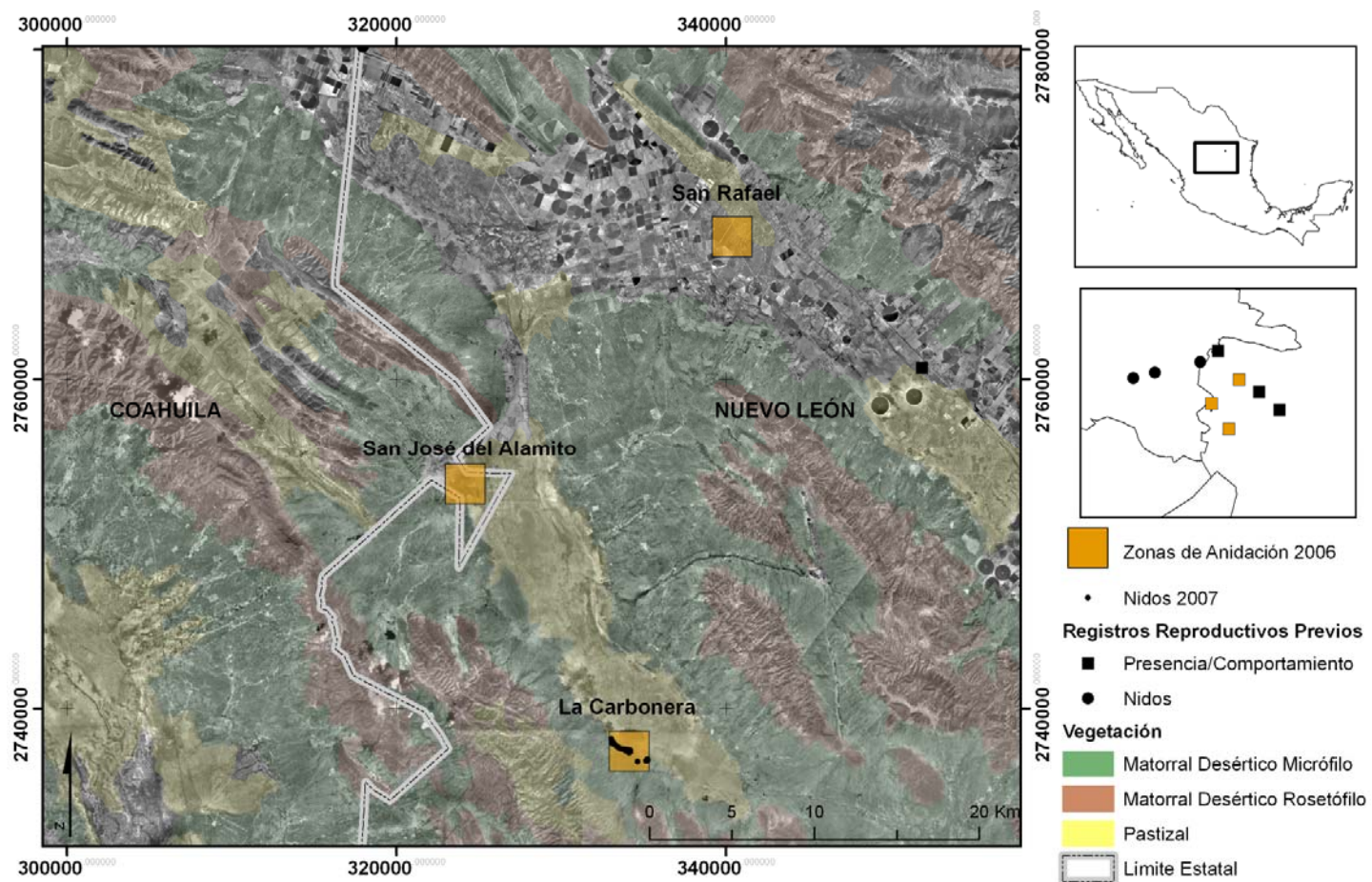


Figura 4.2 Nuevos registros reproductivos durante las temporadas 2006-2007 y sus atributos de vegetación. Los sitios reproductivos están localizados en Matorral Desértico Micrófilo asociado a Pastizal.

4.3.3. Éxito reproductivo

La productividad y la probabilidad de supervivencia diaria se estimaron con los nidos encontrados en La Carbonera durante el año 2007 (Figura 4.3). Los nidos fueron monitoreados como se describe en métodos desde el día 11 de junio que se encontró el primer nido activo, hasta el 20 de julio.

Los nidos de *S. wortheni* fueron depredados o destruidos en distintas etapas, siendo el periodo más crítico la incubación en donde el 53.63% de los nidos fueron depredados (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Porcentajes de nidos destruidos y depredados en distintas etapas.

Nidos monitoreados	Destruídos en construcción ($n=1$)	Depredación de huevos ($n=21^*$)	Depredación de pollos ($n=11$)
33	3.03%	53.63%	33.33%

*Se incluyeron 5 nidos abandonados con huevos

Para estimar los parámetros reproductivos se utilizaron los datos de 27 nidos que no fueron destruidos ni depredados antes de completar su puesta, estos fueron monitoreados sistemáticamente (Tabla 4.2). El tamaño de nidada fue de entre 2 y 4 huevos, siendo el promedio de la puesta de 3.22 ± 0.57 huevos. El porcentaje de infertilidad estimado a partir de 9 nidos, que no fueron depredados durante la incubación, fue de 16.6%.

Tabla 4.2. Productividad del gorrión de *S. wortheni* durante la temporada reproductiva 2007.

Nidos que completaron su puesta	No. de huevos	Éxito de eclosión ($n=25$)	Éxito de emancipación
27	34	29.76%	0%

Para estimar el periodo de incubación se basó en un nido que fue monitoreado desde la construcción; la puesta fue asincrónica con una diferencia de un día y en promedio la puesta fue de 3 huevos, mientras que para la incubación se calculó una

duración de 14 días. El periodo estimado para el abandono del nido es de 8 días (Garza-de León *et al.*, 2007) por lo que se consideró el periodo total de anidación en 25 días.

Utilizando el periodo total de incubación se determinó, mediante el programa Mayfield, la probabilidad de supervivencia y probabilidad de éxito en cada etapa y en el total del periodo. La probabilidad de éxito para todo el periodo de anidación fue muy baja (9.56%), mientras que el análisis por etapas mostró que existe una menor probabilidad de éxito en la etapa de pollos con apenas un 13.75% comparado con 33.72% de la etapa de incubación (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Probabilidad de supervivencia diaria y de éxito del gorrión *S. wortheni*. Se muestra la probabilidad por cada etapa y entre paréntesis los intervalos de confianza (95% de confiabilidad).

	Etapa de incubación <i>n</i> =25	Etapa de pollos <i>n</i> =11	Todo el periodo <i>n</i> =27
Probabilidad de supervivencia diaria	0.9253 (0.8904-0.9603)	0.7804 (0.6649-0.8958)	0.8988 (0.8626-0.9350)
Probabilidad de éxito	33.72% (19.68-56.71)	13.75% (3.82-41.46)	9.56% (3.87-22.79%)

4.3.4. Preferencias de anidación

De un total de 38 nidos encontrados durante los periodos reproductivos del 2006-2007 la mayor parte de ellos fueron colocados en el arbusto *F. cernua*, seguido por *Opuntia sp.*, *O. imbricata*, y finalmente por *Lycium sp.* (Figura 4.4) En general, los nidos se fueron construidos a una baja altura (20.06 ± 10.14 cm; *n*=24).

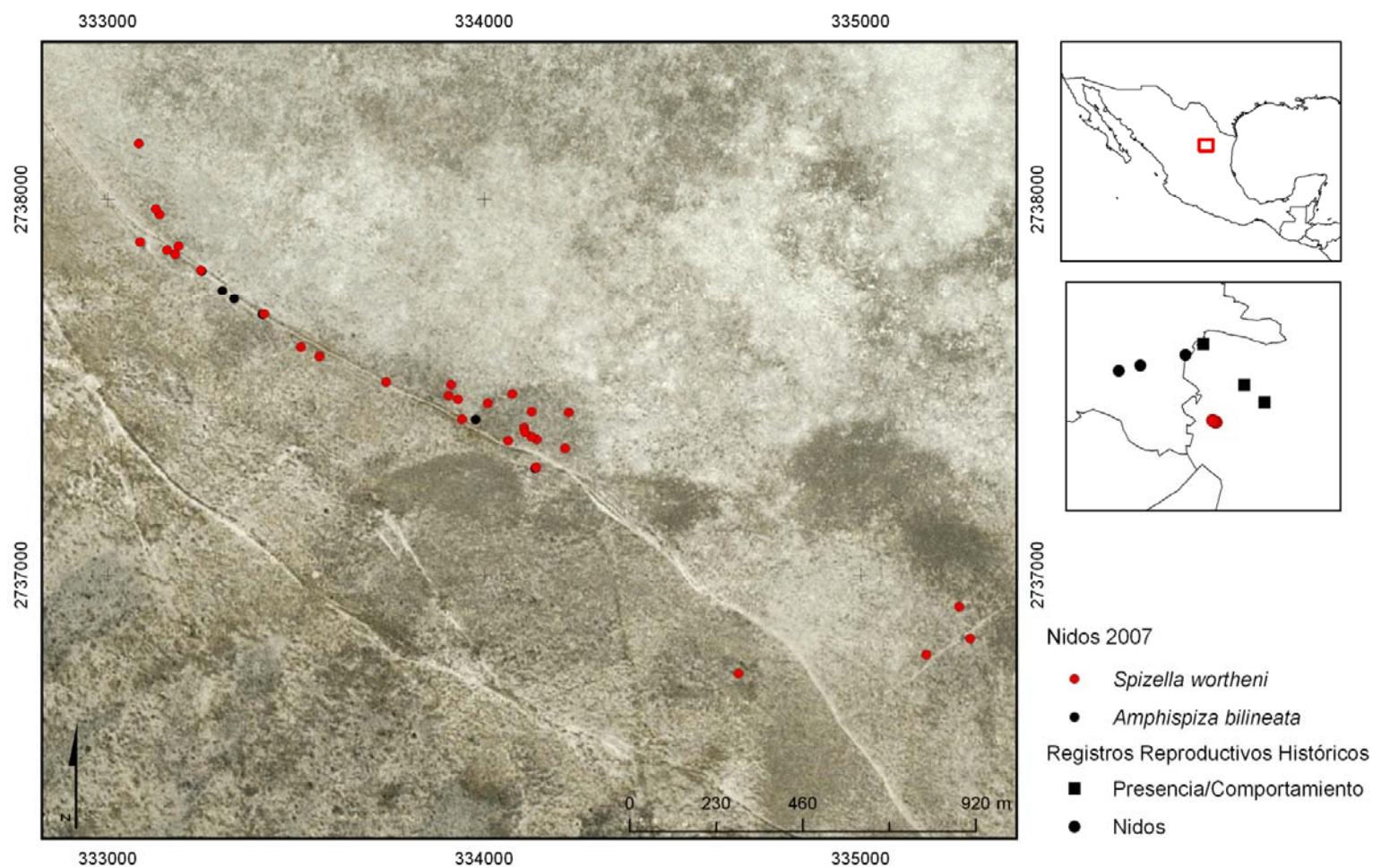


Figura 4.3. Nidos de *S. wortheni* monitoreados durante la temporada 2007 en ejido La Carbonera, Galeana NL.

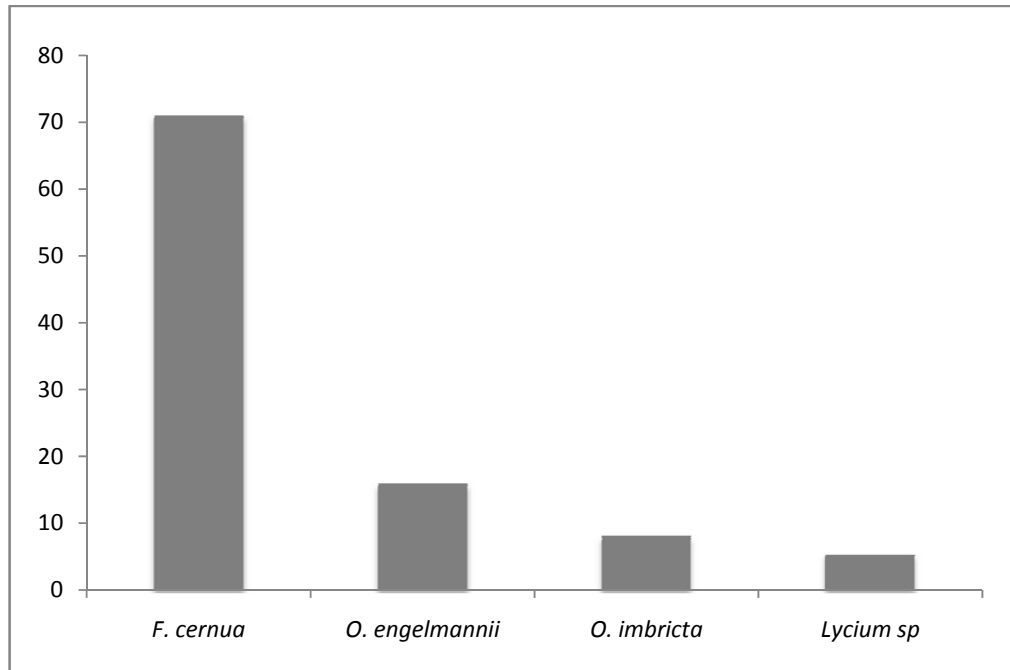


Figura 4.4 Preferencias de anidación del gorrión *S. wortheni*. Se muestra el porcentaje de nidos encontrados en las especies de plantas soporte durante las temporadas reproductivas 2006-2007.

4.3.5. Descripción de los huevos

Se tomaron las medidas de los huevos en aquellos nidos que fueron abandonados o depredados. Los huevos son de color azul-verdoso a azul-claro, su forma es oval y tiene una textura lisa con puntos y manchas café rojizo, el extremo más ancho presenta una corona de manchas de mayor tamaño y de coloración muy intensa. Las medidas de 13 huevos fueron en promedio 17.5 ± 0.74 mm x 13.32 ± 0.39 mm (Apéndice D)

4.4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se identifican tres nuevas localidades reproductivas en San Rafael y La Carbonera, en el municipio de Galeana, NL y San José del Alamito en Saltillo, Coah. Lo anterior se suma a los únicos registros publicados para la distribución del gorrión *S. wortheni* localizado entre los estados de Coahuila: Tanque de Emergencia, (Wege *et al.*, 1993) y recientemente en La India (Garza de León *et al.*, 2007); y en Nuevo León: Las Esperanzas (Behrstock *et al.*, 1997). En cuanto a sus requerimientos ecológicos, se confirma que el hábitat reproductivo para la especie es el matorral desértico micrófilo de hojaseén, como previamente se había reportado (Garza de León *et al.*, 2007) y se agregan especies de los géneros *Lycium* y *Opuntia* como arbustos que sirven de sostén a los nidos de esta especie. Lo anterior, apunta a que el gorrión no es dependiente de alguna especie en particular (Webster, 1954; Wege *et al.*, 1993, Behrstock *et al.*, 1997) sino más bien de la estructura arbustiva de la vegetación asociada a pastizales. El matorral micrófilo de hojaseén se encuentra en el área de La Soledad así como en todo el norte de México, donde todavía existen algunos remanentes asociados a pastizal. Sin embargo, la distribución de la especie parece estar restringida únicamente a estos sitios reproductivos y a sus alrededores, incluso durante el invierno, por lo que la presencia de la especie parece depender de otros factores. Asimismo, se observó una discrepancia entre el tiempo de inicio de la actividad reproductiva, entre años y entre localidades. Durante el 2006 se registró actividad reproductiva similar en las tres áreas, sin embargo durante el 2007 la mayor parte de los nidos fueron encontrados en La Carbonera y en el 2008 no se observó actividad en este sitio (Canales-del-Castillo, datos no publicados). Estos resultados indican que otras variables como la precipitación (Posadas-Leal, 2010), la competencia con otras especies y/o otros requerimientos del hábitat aún no identificados podrían ser factores esenciales para la especie.

Los parámetros reproductivos estimados reflejan la vulnerabilidad de la especie: el porcentaje de éxito en la etapa de incubación fue del 29.76% ($n=25$), menor que en La India, Coah., donde se observó un 71% ($n=5$). Igualmente, para la

etapa de pollo a volantón no reportamos ningún nido exitoso a diferencia del 14% ($n=1$) reportado previamente (Garza-de León *et al.*, 2007). Ahora bien, dicho porcentaje si se encuentra dentro del rango obtenido mediante Mayfield, de 3.87-22.7% de probabilidad de éxito reproductivo. Asimismo, durante el estudio se observaron un grupo de gorriones con 6 volantones, que indica que si hubo nidos exitosos que no fueron localizados. En general, los gorriones que anidan en arbustos ó en pastizales muestran bajo éxito reproductivo: 37.5% en *Xenospiza baileyi* (Olivares de Ita *et al.*, 2001), 25 y 52% en *Ammodramus savannrum* (Vickery, 1996) y 10-44% en *A. bilineata* (Pidgeon *et al.*, 2003). La principal causa del fracaso de los nidos en *S. wortheni* fue la depredación (53.3% en etapa de incubación), esto es similar a lo reportado para aves de pastizal, de hasta 80% (Martín, 1993). Para identificar a los depredadores, se colocaron trampas de arena en algunos nidos ya depredados y cámaras fotográficas automáticas en nidos activos: se encontraron rastros de serpiente y huevos picoteados, y se fotografiaron un coyote y una vaca depredando y/o destruyendo nidos (Apéndice D). Aún más, la actividad ganadera representa un peligro durante la época reproductiva ya que se observó cuando una vaca destruía un nido a su paso.

Asimismo, el bajo éxito reproductivo observado puede estar asociado a la alta densidad de nidos encontrados (Skagen *et al.*, 2010). En un sólo fragmento de vegetación de aproximadamente 29 hectáreas (ha), se encontró el 81.8% de los nidos de *S. wortheni* ($n=27$) con una densidad de 0.93 nidos/ha. Esta densidad es mayor a la observada en el mismo parche para *A. bilineata* (0.20 nidos/ha; $n=6$) y la reportada previamente (0.39 nidos/ha; Pidgeon *et al.*, 2003) para esta especie. Un estudio comparativo asociando variables del tamaño del parche de vegetación y el éxito reproductivo podría indicar cuál es el rango óptimo de densidad de nidos.

Dado que la depresión por endogamia interactúa con el estrés del medio ambiente reduciendo el éxito de eclosión en poblaciones silvestres de aves, (Marr *et al.*, 2006; para una revisión ver también, Bouzat, 2010), evaluamos el porcentaje de eclosión en *S. wortheni*, obteniendo el 16.6% de infertilidad (5 de 30 huevos monitoreados en 9 nidos). Este porcentaje es muy alto si lo comparamos con el de *S. pusilla* del 2% de no-eclosión (8 huevos de 403 monitoreado; Best, 1978) y el promedio calculado de 10.9 % calculado a partir de 99 especies (error estándar= 0.86 y rango=45-100%; Spottiswoode *et al.*, 2004). Sin embargo, dado que la

precipitación y tamaño de muestra son factores que pudieron afectar los valores obtenidos, es necesario evaluarlo en distintas temporadas reproductivas.

A pesar de que en el presente estudio se amplió el número de registros reproductivos dentro del polígono actual de distribución del gorrión *S. wortheni*, no se reportó ningún nido exitoso. Dado que hasta la fecha el tamaño de la población se ha calculado entre 100-120 individuos ó hasta 200 (Canales-del-Castillo, datos no publicados) es preocupante su situación, ya que las poblaciones pequeñas en peligro de extinción son más vulnerables a eventos estocásticos ambientales y demográficos, que sin un manejo podrían caer en el vórtice de extinción. Con base en los resultados, se sugiere mantener la búsqueda de nuevos sitios reproductivos, la cual debe estar enfocada a los fragmentos de matorral desértico micrófilo asociados a los pastizales; censar y estimar el éxito reproductivo simultáneamente; y estudiar los movimientos locales del gorrión para tener un mejor conocimiento del uso del hábitat. Debido a que los pastizales del noreste de México están siendo transformados en zonas de pastoreo y agrícolas, se recomienda que los esfuerzos de conservación estén dirigidos a proteger los sitios reproductivos del gorrión *S. wortheni*.

LITERATURA CITADA

- Bart J, Robson DS 1982. Estimating survivorship when the subjects are visited periodically. *Ecology* 63: 1078–1090.
- Behrstock RA, Sexton CW, Lasley GW, Eubanks TL, Gee JP. 1997. First nesting records of Worthen's Sparrow *Spizella wortheni* for Nuevo León, México, with a habitat characterization of the nest and notes on ecology, voice, additional recent sightings and leg coloration. *Cotinga* 8:27-33.
- BirdLife International (2010) Species factsheet: *Spizella wortheni*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 27/9/2010.
- Best L. 1978. Field sparrow reproductive success and nesting ecology. *Auk* 95:9–22.
- Bouzat, JL.2010. Conservation genetics of population bottlenecks: the role of chance, selection and history. *Conservation Genetics* 11:463-478.
- Canales-Delgadillo JL, Scott-Morales L, Cotera-Correa M, Pando-Moreno M. 2007. Observaciones sobre los sucesos de temporada reproductiva de *Spizella wortheni*. *Ciencia UANL* X:160-167.
- Canales-Delgadillo JL, Scott-Morales M, Cotera-Correa M, Pando-Moreno, M. 2008. Observations on flocking behavior of Worthen's Sparrow (*Spizella wortheni*) and occurrence in mixed-species flocks. *Wilson Journal of Ornithology* 120: 569-574.
- Garza-de León AI, Morán Rosales F, Cancino de la Fuente F, Tinajero Hernández R, López de Aquino S. 2007. Parámetros reproductivos y nueva localidad de anidación para el gorrión de Worthen (*Spizella wortheni*) en el estado de Coahuila, México. *Ornitología Neotropical* 18:243-249.
- Martin TE. 1993. Nest predation among vegetation layers and habitat types: revising the dogmas. *Am. Nat.* 141:897-913.
- Martin TE, Geupel GR. 1993. Nest-monitoring plots: methods for locating nests and monitoring success. *Journal of Field Ornithology* 64:597-519.

- Marr AB, Arcese P, Hochachka WM, Reid JM, Keller LF. 2006. Interactive effects of environmental stress and inbreeding on reproductive traits in a wild population. *J Anim Ecol* 75:1406-1415.
- Pidgeon AM, Radeloff VC, Mathews NE. 2003. Landscape-scale patterns of black-throated sparrow (*Amphispiza bilineata*) abundance and nest success. *Ecological Applications*, 13, pp. 530–542.
- Scott-Morales L, Nocedal J, Cotera M, Canales-Delgadillo J. 2008. Worthen's Sparrow (*Spizella wortheni*) in the northern Mexican Plateau. *Southwestern Naturalist* 53:91-95.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2001. 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. Secretaría de Gobernación, México, D. F. Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo de 2002. Available on: <http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/Normas Oficiales Mexicanas vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf>
- Skagen SK, Yackel AA. 2010. Are there optimal densities for prairie birds. *The Condor* 112:8-14.
- Spottiswoode C, Møller AP. 2004. Genetic similarity and hatching success in birds. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 271:267–272.
- Thayer, J. E. 1925. The nesting of the Worthen's Sparrow in Tamaulipas. *Condor* 27:34.
- Vickery PD. 1996. Grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum*). In: *The Birds of North America*, no. 239 (eds Poole A, Gill F). Academy of Natural Sciences, Philadelphia/American Ornithologists Union, Washington, DC.
- Webster JD. 1954. Breeding bird census: mesquite grassland with scattered junipers. *Audubon Field Notes* 8:376-377.
- Webster JD, Orr RT. 1954. Summering birds of Zacatecas, Mexico, with a description of a new race of Worthen Sparrow. *Condor* 56:155-160.
- Wege DC, Howell SNG, Sada, AM. 1993. The distribution and status of Worthen's Sparrow *Spizella wortheni*: a review. *Bird Conservation International* 3:211-220.

CONCLUSIONES

Los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos con secuencias mitocondriales indican que a pesar de las similitudes superficiales, *Spizella wortheni* no es el taxón hermano de *S. pusilla*, sino que además se encuentra más relacionada con *S. breweri*.

La reciente expansión del género *Spizella* hace 2 millones de años se refleja como politomías en la hipótesis filogenética.

Lo anterior confirma que los rasgos morfológicos de plumaje en gorriones no son adecuados para reconstruir la filogenia en grupos de aves que tienen similitudes ecológicas.

La comparación de las divergencias de la región control mitocondrial a tres niveles taxonómicos en gorriones de la familia Emberizidae variaron entre sí, indicando que la tasa de mutación de este dominio no es constante. Además su comparación con los valores de divergencia del gen citocromo-*b* muestra que el dominio I no varía en varios órdenes de magnitud, como se esperaba, sino apenas 1.99 veces más rápido que el citocromo-*b*.

El gorrión *S. wortheni* no presenta bajos niveles de diversidad genética ni señales de un cuello de botella, como se esperaba, si no que tiene valores similares a gorriones no amenazados de amplia distribución.

Se reportan tres nuevas localidades reproductivas del gorrión *S. wortheni* en los ejidos San Rafael, Carbonera- el Rancho El Compromiso, Municipio de Galeana, en el estado de Nuevo León, y San José del Alamito en el municipio de Saltillo, en el estado de Coahuila.

Se confirma que el hábitat reproductivo para la especie es el matorral desértico micrófilo, principalmente de hojasén (*Flourensia cernua*), como previamente se había reportado. Confirmando que el gorrión no es dependiente de alguna especie en particular sino más bien de la estructura arbustiva de la vegetación asociada a pastizales.

El éxito reproductivo de *S. wortheni* para el periodo de anidación fue cero, pero se obtuvo una probabilidad de éxito de 9.56%. La causa principal del fracaso reproductivo fue la depredación. Variables como la infertilidad, la alta densidad de nidos y la alta precipitación podrían haber participado sinérgicamente en detrimento del éxito.

APÉNDICE A

Tabla 1. Especímenes y/o acceso al GeneBank de los especímenes utilizados en la reconstrucción filogenético.

TAXON	Número de acceso del GenBank				
	Cyt- <i>b</i>	ND2	CRI	ATPase 6/8	COI
<i>Spizella breweri</i>	MBM (?) GAV2239	MBM (?) GAV2239	MBM (?) GAV2239	MBM (?) GAV2239	DQ434134
<i>Spizella pusilla</i>	JF Bell(?) Jk96-014	JF Bell(?) Jk96-014)	MBM (DLD7152)	AF468632	DQ433194
<i>Spizella pallida</i>	JF Bell (?) Jdw0046	JF Bell (?) Jdw0046	AF122949	AF468630	DQ434136
<i>Spizella passerina</i>	MBM (?) JK01-281	MBM (?) JK01-281	AY862812	MBM (¿) JK01-281	DQ433193
<i>Spizella atrogularis</i>	MBM (?) Jk01-210	MBM (?) Jk01-210	MBM jk01-210	MBM (¿) Jk01-210	DQ433192
<i>Spizella wortheni</i>	N.L. México	N.L. México	N.L. México	N.L. México	N.L. México
<i>Chondestes grammacus</i>	MBM (?)	MBM (?)	FJ348340 - 341	AF468633	Kerr et al., 2007
<i>Amphispiza bilineata</i>	MBM (?)	MBM (?)	N. L., Mexico	AF468635	Kerr et al., 2007

APÉNDICE B

Tabla 2 .Especies y numero de accesos al GeneBank para las secuencias utilizadas en la tasa relativa de evolución del dominio I de la región control y citocromo-*b* del ADNm.

	Genero	Especie	región control	citocromo- <i>b</i>
Orden				
Passeriformes				
Familia				
Emberizidae	<i>Melospiza</i>	<i>M. melodia</i>		EF529938
		<i>M. georgiana</i>	AF038817	
	<i>Pipilo</i>	<i>P. maculatus</i>	AF092247	FJ547259
	<i>Melozone</i>	<i>M. kieneri</i>	AF092244	FJ547256
	<i>Spizella</i>	<i>S. passerina</i>	AY862812	FJ547278
		<i>S. breweri</i>	AF122950	AF122950
		<i>S. breweri</i>	AF122951	AF122951
		<i>S. breweri</i>	AF122952	AF122952
		<i>S. breweri</i>	AF122953	AF122953
		<i>S. breweri</i>	GAV2239	GAV2239
	<i>Chondestes</i>	<i>C. grammacus</i>	FJ348339	MBM (?)
	<i>Amphispiza</i>	<i>A. bilineata</i>	MBM (?)	MBM (?)
	<i>Passerella</i>	<i>P. illiaca</i>	AY138903	FJ547284
	<i>Zonotrichia</i>	<i>Z. leucophrys</i>	AY138909	EU325785
	<i>Junco</i>	<i>J. hyemalis</i>	AY995307	EU325787

APÉNDICE C

Tabla 1. Haplotipos y sitios variables encontrados en las secuencias de la región control del ADNm de *S. wortheni* en las poblaciones invernales y reproductivas.

Haplotipos	Sitios variables								Frecuencia de Haplotipos		
	0	1	1	1	2	3	2	2	Invernal n=25	Reproductivo n=10	Ambos n=38
	0	2	3	6	3		6	8			
	9	9	1	1	4	2	0	3			
	8										
1	C	G	G	T	G	A	G	C	0.36	0.31	0.34
2	.	.	.	C	0.20	0.15	0.18
3	.	.	.	C	A	.	.	.	0.12	0.23	0.15
4	A	.	.	.	0.20	0.15	0.18
5	T	.	.	C	-	0.08	0.03
6	A	G	.	.	-	0.08	0.03
7	.	.	A	C	.	.	A	.	0.04	-	0.03
8	.	A	A	C	.	.	A	.	0.04	-	0.03
9	.	.	.	C	A	.	.	G	0.04	-	0.03

Tabla 2. Haplotipos y sitios variables encontrados en las secuencias de la región control del ADNm de *S. atrogularis* de Nevada, USA.

Haplotipos	Sitios variables								Frecuencia de haplotipos
	0	1	1	1	1	1	2	2	Nevada, USA n=10
	9	0	3	6	6	7	0		
	4	8	4	2	7	7	9		
1	T	C	T	G	A	A	G		0.3
2	C	.	.	A	.	C	A		0.2
3	G	.	.		0.1
4	C	.	.	A	.	C	.		0.2
5	.	T	.	A	.	.	A		0.1
6	C	.	C	A	.	C	A		0.1

Tabla 3. Haplotipos y sitios variables encontrados en las secuencias de la región control del ADNm de *S. breweri* de Nevada, USA.

Haplotipos	Sitios variables					Frecuencia de haplotipos
	0	1	2	2	3	
	5	2	3	3	1	Nevada, USA n=10
	0	5	4	8	6	
1	A	A	G	G	T	
2	.	.	A	.	.	0.6
3	.	G	A	.	.	0.1
4	G	.	A	A	.	0.1
5	.	.	A	.	C	0.1

Tabla 4. Haplotipos y sitios variables encontrados en las secuencias de la región control del ADNm de *A. bilineata* de Nevada, USA.

Haplotipos	Sitios variables					Frecuencia de haplotipos
	1	1	1	2	3	
	3	4	6	1	0	Nuevo León, Mx n=10
	0	1	2	6	3	
1	C	A	T	T	G	
2	.	G	C	.	.	0.1
3	.	G	.	.	.	0.5
4	G	G	.	.	.	0.1
5	.	G	.	G	.	0.1
6	.	G	.	.	C	0.1

Tabla 5. Haplotipos y sitios variables de las secuencias de la región control del ADNm de *S. passerina* de Chihuahua y Durango México.

Haplotipos	Sitios variables									Frecuencia de haplotipos	
	0	0	0	1	1	1	2	2	2	Chihuahua, Mx n=21	Durango, Mx n=20
	0	4		2	3	9					
	9	2	4	5	2	2	0	3	3		
			5				6	4	8		
E	C	C	G	T	G	G	A	G	G	0.09	0.15
E1	0.05	-
E2	.	.	.	A	.	A	.	.	.	0.05	-
E3	A	G	0.05	0.05
F	T	A	0.61	0.65
G1	T	.	A	.	T	.	.	.	A	-	0.05
G2	T	.	.	.	T	.	.	.	A	0.05	-
J1	T	G	.	A	-	0.05
Y	T	T	A	.	A	0.99	0.05

* Secuencias tomadas de Milá *et al.*, 2006.

APÉNDICE D



Figura 1. Hábitat reproductivo del gorrión *S. wortheni* en el Ejido La Carbonera, Galeana Nuevo León. El parche de vegetación esta consituido principalmente por el arbusto hojasén *Flourensia cernua*.



Figura 2. Diferentes etapas del gorrión *S. wortheni*. Arriba a la izquierda una puesta típica de 3 huevos, arriba a la derecha tres pollos con días de haber eclosionado. Abajo izquierda un volantón exhibiendo los rasgos característicos de plumaje barredado y comisuras del pico amarillas. Finalmente un macho adulto en época reproductiva luciendo una coloración más intensa en la corona.



Figura 4. Huevos de *S. wortheni*.



Figura 5. Depredadores de los nidos del gorrión *S. wortheni*. Cámaras con sensores de movimiento mostraron que algunos de los animales que destruyeron los nidos fueron las vacas así como el coyote. Asimismo fue posible identificar algunos otros depredadores por los rastros tales como aves, coyote y serpientes.

Estimaciones del éxito reproductivo mediante el software Mayfield

MAYFIELD - SURVIVAL RATE ESTIMATION PROGRAM
 Method from BART & ROBSON:
 ESTIMATING SURVIVORSHIP WHEN THE SUBJECTS
 ARE VISITED PERIODICALLY
 (ECOLOGY, 63(4), 1982, pp 1078-1090)

Periodo total

1) INPUT--1,CAA-A---A--A--AA---A--N
 2) INPUT--2,CA---AN
 3) INPUT--3,CAAAA---AAAN
 4) INPUT--4,CA---A--A--A--N
 5) INPUT--5,CA-A-A--A-AA----N
 6) INPUT--6,CA---A--N
 7) INPUT--7,CA--A--A--A-A--A--A---N
 8) INPUT--8,CA-A---A--N
 9) INPUT--9,CA-A---A--A--A--AAA--A-N
 10) INPUT--0,CAA-A--A--A--A--N
 11) INPUT--1,CAAA--N
 12) INPUT--2,CAA-A--A--N
 13) INPUT--3,CA---A--N
 14) INPUT--4,CAA-A---N
 15) INPUT--5,CAN
 16) INPUT--6,CA-----N
 17) INPUT--7,CAA--A--N
 18) INPUT--8,CA--A---A-N
 19) INPUT--9,CA---N
 20) INPUT--0,CA----AA-A---A--N
 21) INPUT--1,CA-AN
 22) INPUT--2,CAAA-AN
 23) INPUT--3,CAA-AA-A--N
 24) INPUT--4,CA-N
 25) INPUT--5,CAAA----A--N
 26) INPUT--6,CA-AA-AA-A---A--N
 27) INPUT--7,CAAA--A-AA-A---N

NDEAD=27 MV=7

LS=	55	20	21	12	2	0	0
LF=	5	3	13	4	1	0	1

Average interval length = 2.145985

Survival rate	= 0.8988	Transformed Survival rate	= 0.4524
Variance	= 0.0003	Variance	= 0.0015
Std. error	= 0.0185	Std. error	= 0.0388

95% Confidence Interval			
Lower	= 0.8626	Lower	= 0.8585
Upper	= 0.9350	Upper	= 0.9313

Huevo-Pollo

1) INPUT--1,CAA-A---A--A---AAA
 2) INPUT--2,CA---A-----N
 3) INPUT--3,CAAA-A---A--A--A
 4) INPUT--4,CA---A
 5) INPUT--5,CA-A-A--A-AA---N
 6) INPUT--6,CA--A--A--AA-A
 7) INPUT--7,CA-A---A
 8) INPUT--8,CAA--A--A--AA
 9) INPUT--9,CAA-A---A--A--AN
 10) INPUT--0,CAAA--N
 11) INPUT--1,CAA-A---A--N
 12) INPUT--2,CA---A--N
 13) INPUT--3,CAN
 14) INPUT--4,CA-----N
 15) INPUT--5,CAA--A--N
 16) INPUT--6,CA-A---A-N
 17) INPUT--7,CA---N
 18) INPUT--8,CA---AA-A-----N
 19) INPUT--9,CA-A
 20) INPUT--0,CAAA-AN
 21) INPUT--1,CA-A-AA-A--N
 22) INPUT--2,CA-N
 23) INPUT--3,CAAA----A
 24) INPUT--4,CAAA-AA-A
 25) INPUT--5,CAAA--A-AA-A--N

NDEAD=16 MV=7

LS=	51	20	15	10	1	0	0
LF=	3	2	6	2	0	1	2

Average interval length = 2.070796

Survival rate =	0.9253	Transformed Survival rate =	0.3853
Variance =	0.0003	Variance =	0.0019
Std. error =	0.0178	Std. error =	0.0441

	95% Confidence Interval		
Lower	= 0.8904	Lower	= 0.8855
Upper	= 0.9603	Upper	= 0.9558

Pollo-volantón

1) INPUT--1,CA--N
 2) INPUT--2,CA-N
 3) INPUT--3,CA--A--AN
 4) INPUT--4,CA---A--N
 5) INPUT--5,CA--A---N
 6) INPUT--6,CA--N
 7) INPUT--7,CAA--A--N
 8) INPUT--8,CAA-A---N
 9) INPUT--9,CAN
 10) INPUT--0,CA--N
 11) INPUT--1,CA--N

NDEAD=11 MV=4

LS= 13 1 4 1
 LF= 2 1 6 2

Average interval length = 2.033333

Survival rate	= 0.7804	Transformed Survival rate	= 0.6293
Variance	= 0.0035	Variance	= 0.0054
Std. error	= 0.0589	Std. error	= 0.0736

95% Confidence Interval			
Lower	= 0.6649	Lower	= 0.6384
Upper	= 0.8958	Upper	= 0.8765

RESUMEN BIOGRÁFICO

Ricardo Canales del Castillo

Candidato para el Grado de
Doctora en Ciencias con Acentuación en Manejo de vida Silvestre y Desarrollo
Sustentable

Tesis: BIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN DEL GORRIÓN
AMENAZADO Y ENDÉMICO DEL NORESTE DE MÉXICO.

Campo de Estudio: Biología y Genética de la Conservación

Datos Personales: Nacido en México, DF, el 18 de Junio de 1978, hijo de Jesús
Ricardo Canales Ramos y Ana Jesús del Castillo Dávila.

Educación: Químico Bacteriólog Parasitólogo egresado de la Facultad de Ciencias
Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido con
reconocimiento el Julio del 2002.

Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología egresado de la Facultad de
Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo Leon, grado obtenido
con Mención Honorifica en Noviembre del 2005.

Experiencia Profesional: Investigador de Tiempo Completo de la Universidad
Autónoma de Nuevo León desde Mayo del 2010.