Uso de código de barras de ADN para la diferenciación genética de fenotipos de la ardilla roja (*Sciurus granatensis)* asociada a un gradiente altitudinal en la Sierra Nevada de Santa Marta, Magdalena Colombia.

Arsenio Pardo González

Universidad Magdalena

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Santa Marta Magdalena, Colombia

2020

Uso de código de barras de ADN para la diferenciación genética de fenotipos de la ardilla roja (*Sciurus granatensis)* asociada a un gradiente altitudinal en la Sierra Nevada de Santa Marta, Magdalena Colombia.

Arsenio Pardo González

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:

Biólogo

Director (a):

Doctora Diana P. Tamaris Turizo

Codirector (a):

Candidato a Doctor Gilberto Junior Orozco Berdugo

Línea de Investigación:

Biología Molecular

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación Biodiversidad y Ecología Aplicada (GIBEA)

Universidad del Magdalena

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Santa Marta Magdalena, Colombia

2020

Nota de aceptación:

Aprobado por el Consejo de Programa en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad del Magdalena para optar al título de (escriba el nombre del Programa**)**

_____

Jurado

_____

Jurado

Santa Marta, ____ de ____del _____

"Vale más la tenacidad que la genialidad, la perseverancia que el talento natural, porque en tanto que la genialidad y la inteligencia pueden vacilar en la lucha, cansarse y claudicar, la tenacidad prosigue poco a poco, pero con seguridad, hasta llegar a la meta".

Braulio Pérez Marcio

Agradecimientos

Agradezco a Dios por su constante ayuda en la adversidad. A mis padres Manuel Alfredo Pardo Martínez y Rosalba González Barbosa por su cariño y apoyo, que con humildad me instan al mejoramiento permanente, su ejemplo de amor y mansedumbre son el mejor motor para lograr mis objetivos.

Agradezco a la profesora Diana Tamaris Turizo por ser mi tutora, guía y amiga, en este interesante recorrido. Enseñándome que el aprendizaje requiere de una alta dosis de empatía, interés y paciencia para cada situación que se nos presente.

Agradezco al profesor Gilberto Junior Orozco, por su apoyo e interés en el proyecto, por darme las herramientas para poder llevarlo a buen término.

Agradezco a mi evaluador Juan Carlos Aguirre por su presteza, humanidad y humildad, enseñándome que el conocimiento es de todos y para todos, sin reserva ni egoísmo.

Agradezco a Edison Lea Charris, por su apoyo incondicional en el laboratorio, compartiendo su conocimiento y participando desinteresadamente en el desarrollo del proyecto.

Agradezco al Centro de secuenciación de ADN de la Universidad de los Andes por generar y subsidiar parte de los conjuntos de datos de secuencia. Agradezco al laboratorio de biología molecular de la Universidad del Magdalena GIESEMOL, por abrir sus puertas para poder realizar el trabajo técnico correspondiente.
Agradezco a la Agropecuaria Barlovento y la familia Jiménez en San Pedro de la Sierra por su interés en la conservación e investigación, a su vez por permitirme desarrollar el trabajo de campo en sus instalaciones.

A mi pareja Gyna Ariza y amigos Zayira Brito, Albert Deluque y Jesús Cujia que siempre han estado brindando su apoyo incondicional aportando lo que está a su alcance para lograr este objetivo. Agradezco a todos los jóvenes que han dado sus vidas en la resistencia social, para hacer de este país un mejor lugar para vivir.

Resumen

El uso de código de barras de ADN es una técnica usada ampliamente para diferenciar la variación intra e interespecífica en especies morfológicamente similares. La tribu Sciurini de ardillas arbóreas es uno de los grupos de roedores más diversificados, sin embargo, existen muchos vacíos filogenéticos que no permiten aclarar su organización. La ardilla roja *Sciurus granatensis* muestra una gran variedad de colores en su pelaje desde ocre a un negro predominante, lo que genera controversia en el momento de realizar la identificación taxonómica de la especie. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la identidad taxonómica en fenotipos de *Sciurus granatensis*, determinando la divergencia intra e interespecífica con otras especies del género, mediante el uso del gen citocromo oxidasa b. Se recolectaron 12 muestras de tejido de oreja y pelo, el ADN extraído se amplificó mediante PCR convencional; las secuencias obtenidas se compararon con tres secuencias de *S. granatensis* y 52 de otras especies del género *Sciurus* descargadas del GenBank, las distancias intraespecífica e interespecífica se calcularon mediante el uso del programa MEGA-X usando el promedio de distancia evolutiva, posteriormente se realizaron análisis filogenéticos de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI) de las secuencias. De este análisis se obtuvo que la distancia intraespecífica entre las secuencias colectadas para el presente estudio muestra una baja divergencia (<1%), al contrastarlas con las secuencias de *S. granatensis* del GenBank muestra un nivel de divergencia mayor al 7%. La distancia interespecífica muestra a especies clasificadas como diferentes con valores de distancia bajos (*S. aurogaster* y *S. oculatus* con 0.4%, *S. arizonensis* y *S. nayaritensis* con 0.6%). Se concluye que hay una moderada divergencia entre las secuencias de la especie *S. granatensis* a nivel regional, lo que sugiere realizar estudios más detallados que permitan dar claridad a la incertidumbre taxonómica.

Palabras clave: *Sciurus granatensis*, distancia genética, código de barras de ADN, citocromo oxidasa b.

ABSTRACT

The use of DNA barcoding is a widely used technique to differentiate intra and interspecific variation in morphologically similar species. The Sciurini tribe of tree squirrels is one of the most diversified groups of rodents, however, there are many phylogenetic gaps that do not allow clarification of its organization. The red squirrel *Sciurus granatensis* shows a great variety of colors in its coat from ocher to a predominant black, which generates controversy when carrying out the taxonomic identification of the species. The objective of this work was to evaluate the taxonomic identity in *Sciurus granatensis* phenotypes, determining the intra- and interspecific divergence with other species of the genus, through the use of the cytochrome oxidase b gene. Twelve ear and hair tissue samples were collected, the extracted DNA was amplified by conventional PCR; the sequences obtained were compared with three sequences from *S. granatensis* and 52 from other species of the genus Sciurus downloaded from GenBank, the intraspecific and interspecific distances were calculated using the MEGA-X program using the average evolutionary distance, subsequently analyzes were performed Maximum likelihood (ML) phylogenetics and Bayesian inference (BI) of the sequences. From this analysis it was obtained that the intraspecific distance between the sequences collected for the present study shows a low divergence (<1%), when contrasted with the sequences of *S. granatensis* from GenBank it shows a level of divergence greater than 7%. The interspecific distance shows species classified as different with low distance values (*S. aurogaster* and *S. oculatus* with 0.4%, *S. arizonensis* and *S. nayaritensis* with 0.6%). It is concluded that there is a moderate divergence between the sequences of the species *S. granatensis* at the regional level, which suggests carrying out more detailed studies that allow clarifying the taxonomic uncertainty.

Keywords: *Sciurus granatensis*, genetic distance, DNA barcode, cytochrome oxidase b.

Contenido

Resumen **VI**

Contenido **VIII**

Lista de figuras **IX**

Lista de tablas **X**

Introducción **12**

Objetivos **16**

Área de estudio **17**

Resultados **23**

Discusión **29**

Conclusión **35**

Bibliografía **37**

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Área de estudio: campus de la Universidad del Magdalena, La Tagua y San Pedro de la Sierra, Magdalena Colombia ……...17

Figura 2. Imágenes de *Sciurus granatensis*……19

Figura 3. Árbol de distancia genética intra e interespecífica.……..27

Figura 4. Árbol filogenético del género *Sciurus* usando el modelo ML……28

Figura 5. Árbol filogenético del género *Sciurus*, usando el modelo bayesiano……...29

Figura 6. Inferencia filogenómica mitocondrial de Sciurini usando el modelo ML……...34

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Descripción de los cebadores usados para amplificar el gen cyt b…….20

Tabla 2. Secuencias obtenidas de GenBank……...22

Tabla 3. Distribución de especies del género *Sciurus*……...23

Tabla 4. Lugar de colecta de la especie *Sciurus granatensis*……..23

Tabla 5¡Error! Marcador no definido. Matriz de distancia genética intraespecífica de la especie *Sciurus granatensis*…...25

Tabla 6. Matriz de distancia genética interespecífica de las ardillas arbóreas del género *Sciurus*……...26

Tabla 7. Comparación por pares de secuencias de nucleótidos del citocromo oxidasa b entre diez muestras de ardillas……32

Tabla 8. Comparación por pares de secuencias de nucleótidos del citocromo oxidasa b entre dieciséis muestras de *Sciurus*……32

Lista de símbolos

Símbolo	**Significado**
A	Amperios
BI	Inferencia Bayesiana
°C	Grados Centígrados
ML	Máxima Verosimilitud
mM	Milimolar
cyt b	Citocromo Oxidasa b
pb	Pares de bases
µl	Microlitro
V	Volumen
10x	Concentración

Introducción

Colombia hace parte del grupo de países megadiversos y es el sexto país con mayor número de especies de mamíferos (Ramírez-Chaves et al., 2016). La lista de este grupo se ha visto nutrida en los últimos años, por ejemplo, en el 2013 se reportaban 492 especies nativas (Solari et al., 2013), cifra que se incrementó para el 2016 en 518 especies (Ramírez-Chaves et al., 2016).

El Caribe de Colombia representa el 11.6% de la superficie terrestre del país (Mesa-S et al., 2016). Esta región presenta una amplia diversidad de ambientes desde desiertos hasta bosques húmedos, ciénagas y cadenas montañosas como la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serranía del Perijá (Mesa-S et al., 2016).

En cuanto a la clase Mammalia para esta área se registra un total aproximado de 208 especies (Solari et al., 2013), un número considerablemente bajo para las condiciones ecosistémicas de la región. Los estudios de la mastofauna siguen siendo escasos, por ello el conocimiento de la distribución geográfica de las especies se limita a las localidades de los ejemplares que reposan en los centros de colecciones de mayor trascendencia en el país (García-Herrera et al., 2015).

La conservación de este grupo representa uno de los grandes desafíos. La actividad humana ha impulsado la pérdida y fragmentación de hábitats, esto además de ser una amenaza importante para los mamíferos terrestres (Costa et al., 2005) y el resto de la diversidad biológica, también causa alteraciones en los ecosistemas y cambian la disponibilidad de recursos (Vera y Conde y Rocha, 2006). La pérdida y fragmentación del hábitat impulsa la disminución de la fauna, llevándola a un declive crítico (Galetti y Dirzo, 2013). Esta disminución varía entre especies, si bien algunas son más sensibles a las perturbaciones y se extinguen en hábitats pequeños, otras responden satisfactoriamente a los entornos reducidos como pequeños fragmentos de bosque (Rangel-Negrín et al., 2014).

En Colombia la tasa de deforestación es alta, en los últimos 20 años se reporta una perdida aproximada de 5.4 millones de hectáreas de bosque, siendo la cuenca del Magdalena la más deforestada en Sudamérica y a nivel mundial se cataloga como la décima (García-Romero, 2013; Restrepo et al., 2016). Los bosques tropicales han sido perturbados, convirtiéndose en paisajes homogéneos (jardines, zonas de cultivo, parques), algunas especies de roedores como las ardillas pueden permanecer en fragmentos vegetales usando los recursos disponibles (Garcés-

Restrepo y Saavedra-Rodriguez, 2013). Todas las ardillas del Neotrópico son diurnas, presentando picos de actividad en la mañana, viéndose solitarias o en pareja; algunas se pueden encontrar en todo el bosque, otras prefieren vegetación ribereña o las copas de los árboles (Voss y Emmons, 1996). Colombia cuenta con 12 especies, distribuidas en todas las regiones geográficas de Colombia, excepto en la zona Insular. (Alberico et al., 2000; Patton et al., 2015; Ramírez-Chaves et al., 2016).

Una especie conspicua de ambientes naturales e intervenidos es la ardilla roja *Sciurus granatensis* (Garcés-Restrepo y Saavedra-Rodriguez, 2013). Esta especie arborícola pertenece a la tribu Sciurini, familia Sciuridae y presenta un color de pelaje variable, generalmente con un dorso ocre variando de amarillo opaco a predominantemente negro; el vientre puede ser blanco o en algunos casos anaranjado (Nitikman, 1985). De acuerdo a esto, Emmons (1990) propone tres fenotipos: el primero distribuido en el norte de Colombia que se caracteriza por tener una cola y dorso rojizo-naranja y el vientre blanco; el segundo en el oriente del país, presenta un dorso y cola con pelaje de color marrón-oliva, con vientre rojo oscuro a naranja; el tercero en la costa occidental de Colombia, presenta un dorso de color negro-oliva y extremidades y pies rojos a naranja, con cola de punta negra.

Según Arango et al. (2007), en su trabajo variación cariológica en diferentes fenotipos de S*ciurus granatensis*, encontraron que no hay relación entre cariotipo y fenotipo, señalando que posiblemente la variación del pelaje sea resultado de las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestas. Esta variedad de fenotipos ha llevado a la discusión entre diferentes autores como Patton y colaboradores (2015), que señala la existencia de 6 sub especies y a Thorington et al. (2012) quien reconoce 32 sub especies para *S. granatensis.*

En un análisis cladístico de especies mesoamericanas del género *Sciurus,* empleando caracteres craneales y postcraneales realizado por Villalobos y Cervantes (2007), relaciona a *Sciurus granatensis*, *Microsiurus alfari, Sciurus deppei y Sciurus yucatanensis* en un mismo clado. Años más tarde Villalobos y Gutiérrez (2014) en su trabajo de filogenia molecular de ardillas arbóreas mesoamericanas en el que emplean el gen mitocondrial Citocromo oxidasa b (**cyt b**), agrupan a *S. granatensis* en una rama monofiletica que contiene a *S. aureogaster* y *S. variegatoides.* En este caso, *S. deppei* es indicada como una politomía.

Mi trabajo se centra en la investigación de la especie de ardilla *S. granatensis*, que es muy común para la región, resulta ser curiosa por la desinformación que se tiene de la misma, ya que no hay trabajos actualizados. El poder ampliar el conocimiento de una especie con la que compartimos diariamente a nivel urbano, ayudará en gran medida a entender su ecología, biología, filogenia y evolución; ya que esta especie al ser politípica, es muy llamativa para la ciencia. Entendiendo la controversia generada por los investigadores, donde no hay un consenso real entre las subespecies que se debieran reconocer. Si bien el diagnóstico morfológico es importante y hay que mantenerlo, este presenta algunos limitantes como: i) la plasticidad fenotípica y/o caracteres morfológicos que no son heredables y que suelen ser usados para el reconocimiento de especies, llevando a identificaciones erróneas; ii) las especies crípticas se pasan por alto generalmente; iii) a menudo faltan claves taxonómicas para identificar ejemplares inmaduros; iv) se requiere de un alto nivel de experiencia, restringiendo esta labor taxonómica a especialistas (Hebert et al., 2003).

En los últimos años el uso de técnicas moleculares ha demostrado ser muy eficiente y complementaria a la hora de resolver incertidumbre taxonómica. Los marcadores moleculares son eficaces porque permiten evaluar la diversidad genética; investigar los factores genéticos asociados a rasgos heredados cuantitativamente; generalmente no se ven asociados a efectos deletéreos con alelos alternativos (Adhikari et al., 2017); no se ven afectados por los tejidos y las etapas del desarrollo; pueden proporcionar información sobre relaciones evolutivas (árboles filogenéticos) dentro de una especie o entre las especies; permiten identificar áreas geográficas de mezcla entre poblaciones con distintos orígenes genéticos; permiten evaluar la variación funcional; investigar la identidad taxonómica de diferentes especies y el ADN puede ser almacenado durante mucho tiempo (de la Herran et al., 2004; Pilling y Rischkowsky, 2010; Guo et al., 2017).

Las ardillas del género *Sciurus* han sido trabajadas ampliamente a nivel molecular. Un estudio que emplea la región control D-loop de la ardilla roja euroasiática (*Sciurus vulgaris*) enmarcado en la conservación por su declive poblacional en las islas británicas (Brownsea, Furzey y wight), deja ver el impacto que produce la introducción de especies ajenas como la ardilla gris (*Sciurus carolinensis*), a los ecosistemas nativos, señalando que es necesario preservar las poblaciones aisladas de ardillas rojas para la conservación de la especie (Hardouin et al., 2019). Otros trabajos han desarrollado marcadores moleculares de microsatélites polimórficos en ardilla gris

oriental (*Sciurus carolinensis)*, siendo útiles en otras especies de ardillas como *Sciurus niger* y *Tamiasciurus hudsonicus*, facilitando estudios de estructura social, movimiento y apareamiento (Fike et al., 2013). En filogenia se han realizado diversas investigaciones, utilizando el gen mitocondrial citocromo oxidasa b (cyt b), como es el caso del estudio filogenético y genotipificación molecular de la especie *Sciurus oculatus* realizado por Monterrubio-Rico et al. (2013), en el que presentan las primeras secuencias del gen cyt b para la especie. Otra investigación con el gen cyt b sobre filogenia y zoogeografía de seis especies de ardillas del género *Sciurus*, permite ver las relaciones filogenéticas y zoogeográficas de las ardillas del nuevo y viejo mundo, sugiriendo que las ardillas del nuevo mundo tuvieron una radiación más temprana que las del viejo mundo (Oshida y Masuda, 2000b).

El código de barras de ADN, es un método que permite el reconocimiento e identificación de especies, usando base de datos de secuencias de ADN estandarizadas. Para poder hacer uso de esta técnica se debe emplear una región del genoma que permita diferenciar entre la variación interespecífica y la intraespecífica, lo que se conoce como “barcoding gap”, es así que entre mayor sea la diferencia entre estas dos (intraespecífico e intraespecífico), la discriminación específica será más acertada (Paz et al., 2011). Por todo lo anterior, este trabajo tiene como propósito evaluar la identidad taxonómica en morfotipos de *S. granatensis* mediante el uso del gen cyt b para contribuir a resolver algunos conflictos actuales en su taxonomía y para determinar cuál podría ser la razón de sus diferencias fenotípicas. Poder generar conocimiento al respecto ampliará el saber científico y ayudará al reconocimiento de la región a nivel nacional y mundial.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la identidad taxonómica en fenotipos de la ardilla roja *Sciurus granatensis* asociada a un gradiente altitudinal de la Sierra Nevada de Santa Marta, mediante el uso del gen Citocromo Oxidasa b (cyt b).

Objetivos específicos

- Determinar el grado de divergencia intraespecífica de los diferentes fenotipos de la ardilla roja *Sciurus granatensis* asociados a un gradiente altitudinal.
- Determinar el grado de divergencia interespecífica de los fenotipos de la ardilla roja *Sciurus granatensis* mediante el uso del gen cyt b.
- Evaluar las relaciones filogenéticas de *Sciurus granatensis* con otras especies del género y su significado con la radiación adaptativa.

Área de estudio

El estudio se realizó en tres localidades (unidades de muestreo): Bosque Seco de la Universidad del Magdalena, La Tagua y San Pedro de la Sierra, las dos últimas están en zonas intermedias de la Sierra Nevada de Santa Marta. El bosque de la Universidad del Magdalena (11°13’18,31” N, 74°11’08,80” W, 21 m) se encuentra en el casco urbano de la ciudad de Santa Marta, en la localidad se presentan dos periodos de sequía y se registra un promedio anual de lluvias de 608,8 mm (Rangel-Ch y Carvajal-Cogollo, 2012)

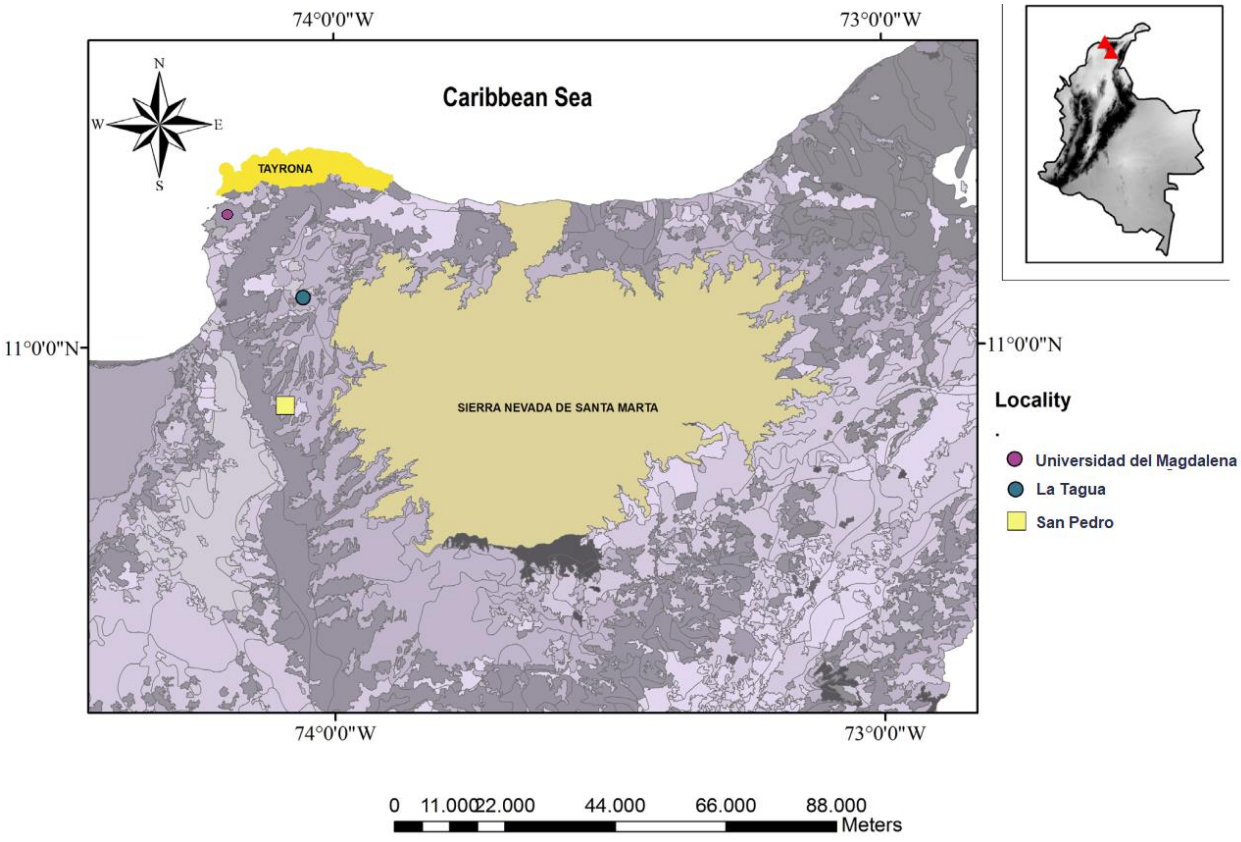

Figura 1. Área de estudio: campus de la Universidad del Magdalena, La Tagua y San Pedro de la Sierra, Magdalena Colombia (Tomado y modificado de Granda-Rodríguez et al., 2014).

La Tagua y San Pedro de la Sierra (11°04’49.19” N, 74°02’31.5” W; 1,580 m; 10°54'06” N, 74°02'00” W; 1,320 m, respectivamente) se encuentra en la cara noroccidental y occidental de la Sierra Nevada de Santa Marta. Estas localidades presentan formaciones de bosque subandino (Rangel-Ch y Garzón, 1995) se registra una precipitación mensual promedio de 190,7 mm, con temperatura máxima de 24,6°C y mínima de 11,1°C, la humedad relativa es del 81,8% y brillo solar promedio de 127,0 h.m, el tipo de clima es de superhúmedo a húmedo, con poco déficit de agua, también se puede encontrar pastizales hasta bosques y selvas de la región ecuatorial, con cerca de 1800 especies de plantas superiores (Rangel-Ch y Garzón, 1995).

Fase de campo

En cada unidad de muestreo se instalaron cinco trampas Tomahawk, previo reconocimiento del paso frecuente de ardillas, separadas a una distancia de 50 m. Capturando por localidad cinco ejemplares, para un total de quince muestras, dos de este conjunto muestras fueron tomadas de individuos previamente cazados por lugareños. Este número de capturas se decidió dado al esfuerzo de muestreo, puesto que la abundancia de la especie responde a la disponibilidad del recurso, haciendo difícil la captura de ejemplares en el tiempo propuesto. Manualmente se tomó tejido de oreja y pelo de la cola con folículo piloso. Cada ardilla se marcó para evitar recapturas. Las marcas se hicieron en las uñas de las patas posteriores con barniz de uñas, reforzado con pegamento instantáneo (cianoacrilato), para aumentar el tiempo de duración de la marca. Las muestras de pelo y oreja se rotularon y fijaron en etanol al 96%. Se describieron morfológicamente de los ejemplares capturados, señalando el color del pelaje presentado (Figura 2). En cada punto de captura se identificó el tipo de bosque o cobertura usando como referencia las categorías de bosque de la FAO 2010 y Mattey-Trigueros et al (2017). Las coordenadas de las localidades se registraron con navegador GPS.

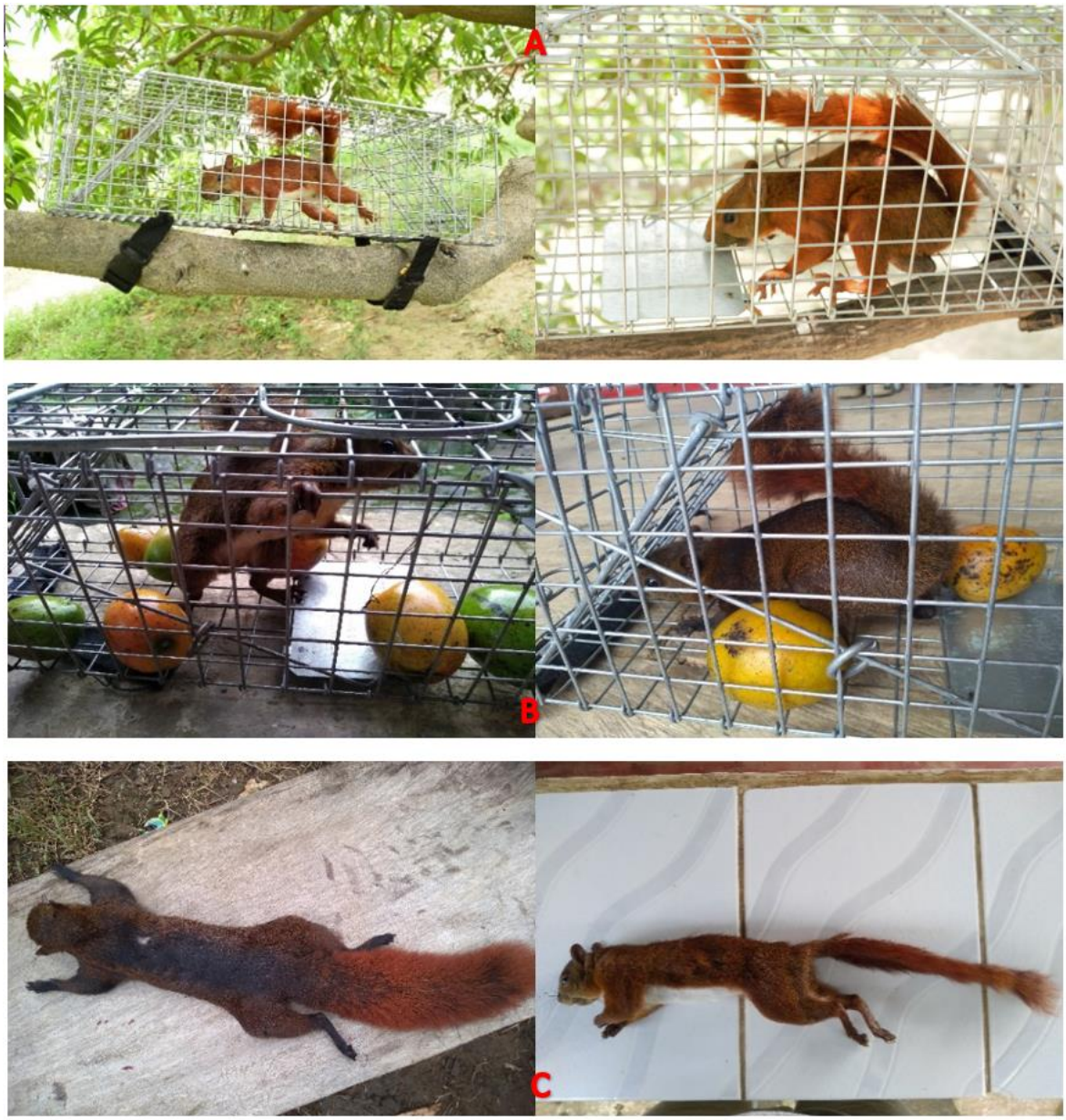

Figura 2. Imágenes de *Sciurus granatensis* colectados en: A. Bosque seco, Universidad del Magdalena; B. La Tagua; C. San Pedro de la Sierra.

Fase de laboratorio

Aislamiento del ADN genómico

Para la extracción de ADN, se empleó el kit de ADN genómico ISOLATE II (BIOLINE, EE.UU.). La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la verificación de la calidad e integridad del ADN, se mezcló 4µL de muestra con 3µL de GelRed (Biotium), como marcador molecular se empleó Hyperladder ™ 50bp (5x). Las muestras fueron sembradas en un gel de agarosa al 1% y se corrieron a 100V, 400A durante 35 min.

Amplificación del Citocromo Oxidasa b del ADN Mitocondrial

La amplificación del ADN mitocondrial se realizó flanqueando el citocromo b (cyt b, 1122 pb; Tabla 1), esto con el fin de detectar diferencias o variaciones entre los individuos colectados en las diferentes unidades de muestreo y comparar con secuencias entre el género *Sciurus* obtenidas del GenBank (Tabla 2).

Tabla 1. Descripción de los cebadores usados para amplificar el gen cyt b.

Nombre	Secuencia primer 5´- 3´	Referencia
MT-CYB		
L14724	GATATGAAAAACCATCGTTG	(Oshida et al., 2000b; Pecnerova et al., 2015)
H15910	GATTTTTGGTTTACAAGACCGAG	(Oshida et al., 2000a; Pecnerova et al., 2015)

El ADN extraído se utilizó como molde para realizar la amplificación de genes para el diagnóstico de la especie de ardilla roja *Sciurus granatensis*, por medio de PCR- convencional. Las amplificaciones se realizaron con ayuda del cebador cyt b empleado por Oshida et al (2000b) y Pecnerova et al (2015) para ardillas del género *Sciurus* (ver Tabla 1). El procedimiento se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler®Pro, usando un volumen final de 25 µL e

incluyendo: 16.125 µL ddH2O, 2.5 µL PCR buffer 10x (Bioline, USA), 1.25 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 1.0 µL de cada primer (0.01 mM), 0.625 µL de cada dNTP (10 Mm), 0.5 µL de ADN de Taq Polimerasa (amb, Canadá) y 2.0 µL de ADN templado (Ivanova et al., 2007). La amplificación se realizó durante 35 ciclos programados y usando los siguientes perfiles de temperatura: 94°C la desnaturalización (3 minutos para el ADN y 1 minuto para el cebador), el alineamiento a 55°C por 1 minuto, la reacción de extensión se efectuó a 72°C por 10 minutos. La verificación se realizó por electroforesis con gel de agarosa al 2%, con tinción GelRed (Biotum) y usando un marcador de peso molecular de referencia de 1000pb (Hyperladder ™ IV).

Análisis de datos

De las 15 secuencias obtenidas en la fase de laboratorio (1040 pb), dos fueron descartadas por presentar errores en el marco de lectura, quedando un total de 12 (2 *S.granatensis col; 3 S.granatensis col; 4 S.granatensis col; 5 S.granatensis col; 6 S.granatensis col; 7 S.granatensis col; 8 S.granatensis col; 9 S.granatensis col; 10 S.granatensis col; 12 S.granatensis col; 13 S.granatensis col; 14 S.granatensis col)*, estas en conjunto con las secuencias obtenidas en el GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (Tabla 2), se editaron visualmente con la ayuda de los electroferogramas y se verificó su identidad mediante la herramienta BLAST del GenBank; adicionalmente, se alinearon usando el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.,* 1994) en el programa MEGA-X y se calcularon las distancias interespecíficas e intraespecíficas usando el promedio de distancia evolutiva.

Tabla 2. Descripción de las secuencias obtenidas de GenBank, a partir del gen cyt b

Especie	GenBank				
S. granatensis	NC050018	HG962398	KC758866		
S. variegatoides	HG962415	KC777296	KC777295	KC777297	
S. stramineus	AB030025	AB292678			
S. spadiceus	HG962410				
S. oculatus	KC261417	JQ627638			
S. niger	U10180	MH766474	MH766473	MH766472	MH766471
S. lis	AB192923	AB192922	AB192921	AB192920	AB192919
S. deppei	KC777298				
S. carolinensis	FJ200744				
S. anomalus	AB292676	AB292675			
S. aestuans	KU253491	KU253490	AJ389530		
S. vulgaris	AB775131	JQ395053	JQ395054	JQ395052	JQ395051
S. aureogaster	KC737847				
S. aberti	U10177	U10176	U10175	U10174	U10173
S. yucatanensis	NC050016	MT240885			
S. pucheranii	NC050017	MT240886			
S. nayaritensis	NC050014	MT240883			
S. ignitus	MT259128	MT259124			
S. griseus	MT211955	NC 050034			
S. colliaei	NC050013	MT240882			
S. arizonensis	NC050011	MT240880			
A. rufa	AJ389528				

Para la reconstrucción filogenética se empleó máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI), utilizando los programas MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al*., 2012) y RAxML 8.0.24 (Stamatakis, 2006). Los análisis filogenéticos se realizaron usando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+I+G, con una tasa de I = 0.5330 y G = 2.2120, obtenido en el programa jmodetest v2.1.10 (Darriba et al, 2012), usando 88 modelos más probables y el criterio de información Akaike (AIC) para evaluar estadísticamente el mejor modelo.

Finalmente se relacionó la distribución de las especies por lugar de origen (Tabla 3) y lugar de colecta (Tabla 4).

Tabla 3. Distribución de especies del género *Sciurus* (Rodentia: Sciuridae), la tribu Sciurini del grupo de ardillas arbóreas (Tomado y modificado de Villalobos y Cervantes-Reza, 2007).

Tribu	**Especie**	**Distribución**
Sciurini	*S. aestuans*	sur de Venezuela, las Guayanas, Brasil, Paraguay, noreste de Argentina
	S. granatensis	Costa Rica, Panamá, Colombia, norte de Venezuela, Ecuador
	S. ignitus	Colombia, Ecuador, Perú, oeste de Brasil, Bolivia, noroeste de Argentina
	S. pucheranii	Colombia, Ecuador, Perú
	S. spadiceus	sureste de Colombia, este de Ecuador, este de Perú, Bolivia, oeste y centro de Brasil
	S. stramineus	suroeste de Ecuador, noroeste de Perú
	S. aureogaster	este y sur de México, Guatemala
	S. colliaei	occidente de México
	S. deppei	del este de México al norte de Costa Rica
	S. nayaritensis	Extremo sureste de Arizona, oeste de México
	S. oculatus	centro de méxico
	S. variegatoides	extremo sur de México a Panamá
	S. yucatanensis	Península de Yucatán, norte de Guatemala, Belice
	S. aberti	suroeste de Estados Unidos, noroeste de México
	S. arizonensis	centro y sureste de Arizona, centro-oeste de Nuevo México, extremo noroeste de México
	S. carolinensis	sureste de Canadá, este de Estados Unidos
	S. griseus	centro-norte de Washington al sur de California
	S. niger	centro y este de Estados Unidos, noreste de México
	S. anomalus	Cáucaso, Asia Menor, Siria, Palestina, Irán occidental
	S. vulgaris	Europa y norte de Asia
	S. lis	Japón
	A. rufa	Norte América

Tabla 4. Lugar de colecta de los especímenes de Sciurus *granatensis* (Rodentia: Sciuridae) usados para este estudio.

Especie	**Colecta**	**Referencia**
*14.S. granatensis_* col	Colombia	Presente estudio
*13.S. granatensis_* col		
*12.S. granatensis_* col		
*10.S. granatensis_* col		
*9.S. granatensis_* col		
*8.S. granatensis_* col		
*7.S. granatensis_* col		
*6.S. granatensis_* col		
*5.S. granatensis_* col		
*4.S. granatensis_* col		
*3.S. granatensis_* col		
*2.S. granatensis_* col		
NC_050018.1_*S. granatensis*	Ecuador	(de Abreu-Jr et al., 2020)
HG962398.1_*S. granatensis*	Centro América	(Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014; Pečnerová et al., 2015)
KC758866.1_*S. granatensis*		

Resultados

Análisis preliminar de las secuencias

El análisis se realizó con un total de 67 secuencias del gen cyt b, 55 de las cuales fueron tomadas de las disponibles en el GenBank, 54 para el género *Sciurus* (*S. granatensis* (3) genoma completo: *s. variegatoides* (4): *S.stramineus* (2): *S. spadiceus* (1): *S. oculatus* (2): *S. niger* (5): *S. lis* (5): *S.deppei* (1): *S. carolinensis* (1): *S. anomalus* (2): *S. aestuans* (3): *S. vulgaris* (5): *S. aureogaster* (1): *S. aberti* (5): *S. yucatensis* (2) genoma completo: *S. pucheranii* (2) genoma completo: *S. nayaritensis* (2) genoma completo: *S. ignitus* (2) genoma completo: *S. griseus* (2) genoma completo: *S. colliaei* (2) genoma completo: *S. arizonensis* (2) genoma completo) y una para el grupo externo *Aplodontia rufa* (Tabla 2). Las otras 12 secuencias fueron las recolectadas para el presente estudio en la ciudad de Santa Marta y la Sierra Nevada de Santa Marta. Posteriormente se realizó la edición y el alineamiento con MEGA-X, tomando un tamaño de 1040 pb.

Estimación de distancia genética

Distancia genética intraespecífica de la especie *Sciurus granatensis*

En la Tabla 5, podemos observar que la distancia intraespecífica entre las secuencias de las ardillas colectadas para el presente estudio (*S. granatensis*_col) muestran una baja divergencia (< 1%), mientras que las secuencias de *S. granatensis* tomadas del GenBank al ser comparadas con las secuencias *S. granatensis* col muestran un nivel de divergencia mayor al 7%. Este valor de distancia genética parece ser un poco alto para secuencias que están identificadas como una misma especie (Figura 3a).

Tabla 5. Matriz de distancia genética intraespecífica de la especie *Sciurus granatensis.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 14.*S.granatensis* _col															
2 13.*S.granatensis* _col	0,4														
3 12.*S.granatensis* _col	0,9	0,9													
4 10.*S.granatensis* _col	0,5	0,5	1,0												
5 9.*S.granatensis* _col	0,4	0,4	0,9	0,5											
6 8.*S.granatensis* _col	0,5	0,5	1,0	0,2	0,5										
7 7.*S.granatensis* _col	0,6	0,6	1,1	0,5	0,6	0,4									
8 6.*S.granatensis* _col	0,3	0,1	0,8	0,4	0,3	0,4	0,5								
9 5.*S.granatensis* _col	0,5	0,5	1,0	0,6	0,5	0,6	0,5	0,4							
10 4.*S.granatensis* _col	0,6	0,6	1,1	0,3	0,6	0,3	0,6	0,5	0,7						
11 3.*S.granatensis* _col	0,3	0,3	0,8	0,4	0,3	0,4	0,5	0,2	0,2	0,5					
12 2.*S.granatensis* _col	0,5	0,3	1,0	0,4	0,5	0,4	0,5	0,2	0,6	0,5	0,4				
13 NC_050018.1_*S_granatensis*	9,3	9,4	9,4	9,4	9,3	9,4	9,7	9,4	9,6	9,5	9,4	9,4			
14 HG962398.1_*S_granatensis*	7,4	7,8	7,4	7,9	7,8	7,9	8,0	7,7	7,9	8,0	7,7	7,7	7,9		
15 KC758866.1_*S_granatensis*	7,7	7,9	7,7	8,2	8,1	8,2	8,4	7,8	8,2	8,4	8,0	7,8	8,0	1,5	
16 AJ389528.1 *A.rufa*	35	35	35,5	35,3	35,5	34,9	35,3	35,2	35,7	35,6	35,3	35,2	37,5	35,3	34,5

Distancia genética interespecífica del género *Sciurus*

En la Tabla 6 se observan que las especies con menor divergencia interespecífica del género *Sciurus* fueron *S. aurogaster* y *S. oculatus* con 0.4%, *S. arizonensis y s. nayaritensis* con 0.6%, *S. colliaei y S. aureogaster* 3.9%, *S colliaei* y *S. oculatus* 3.9%, *S. vulgaris* y *S. lis* 4.6%, *S. arizonensis* y *S. niger* con 6.3%, *S. nayaritensis* y *S. niger* con 6.8%. No obstante, podemos ver a *S. granatensis* Col y *S. granatensis* (GenBank) con 7.5% lo que se puede considerar un valor alto de divergencia teniendo en cuenta que son la misma especie y los valores presentados anteriormente (Figura 3b). Las especies con mayor divergencia son *S. yucatanensis* y *S. lis* 19,1%, *S. anomalus* y *S. deppei* 19%, *S. anomalus* y *S. spadiceus* 18,9%, *S. aberti* y *S. anomalus* 18,9%, *S. vulgaris* y *S. aestuans* 18,5%, *S. yucatanensis* y *S. vulgaris* 18,5.

Los valores por debajo de 7.5% permiten ver la incertidumbre taxonómica ya que en el caso puntual de (*S. aurogaster* y *S. oculatus* con 0.4%, *S. arizonensis y s. nayaritensis* con 0.6%), se entiende que son especies clasificadas como diferentes, sin embargo, los valores de distancia resultan ser muy bajos, lo que permite observar que estas relaciones por debajo del 7.5% deben ser tenidas en cuenta para futuros análisis.

Tabla 6. Matriz de distancia genética interespecífica de las ardillas arbóreas del género *Sciurus.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 Col																							
2 *S_granatensis*	7,5																						
3 *S_variegatoides*	11,6	11,5																					
4 *S_stramineus*	12,6	13,2	14,2																				
5 *S_spadiceus*	14,5	13,7	14,4	13,6																			
6 *S_oculatus*	11,5	10,9	10,5	12,2	12,6																		
7 *S_niger*	14,5	13,6	15,1	13,4	15,7	14,7																	
8 *S_lis*	18,4	17,8	18,1	17,3	18,0	17,9	17,6																
9 *S_deppei*	13,9	13,4	15,1	13,5	15,4	13,4	15,9	17,6															
10 *S_carolinensis*	14,1	12,9	14,3	14,6	14,7	14,5	13,7	17,4	15,2														
11 *S_anomalus*	17,8	17,6	18,2	17,7	18,9	17,3	15,8	17,6	19,0	17,6													
12 *S_aestuans*	13,4	12,5	13,6	11,8	14,1	12,9	14,6	18,8	15,0	14,5	18,2												
13 *S_vulgaris*	17,7	17,8	17,1	17,7	17,7	17,6	16,3	4,6	18,8	17,4	17,1	18,5											
14 *S_aurogaster*	11,5	10,7	10,4	12,2	12,5	0,4	14,4	17,9	13,3	14,4	17,3	12,6	17,5										
15 *S_aberti*	14,7	15,4	15,8	16,0	15,8	13,7	16,5	18,5	15,5	15,3	18,9	15,7	18,2	13,6									
16 *S_yucatanenesis*	11,0	10,4	8,4	13,8	14,7	10,9	14,7	19,1	15,0	15,6	18,1	13,8	18,5	10,7	16,0								
17 *S_pucharanii*	13,6	14,1	14,6	13,4	12,9	14,6	14,1	18,5	15,1	15,2	18,8	13,5	18,4	14,7	16,1	15,2							
18 *S_nayaritensis*	13,0	12,8	15,1	13,1	14,5	12,5	6,8	16,3	14,9	14,0	17,3	14,2	16,3	12,2	15,6	14,5	13,9						
19 *S_ignitus*	14,5	14,2	14,2	14,2	12,2	14,6	15,6	17,7	14,9	17,4	18,7	14,7	17,1	14,5	17,0	14,6	13,7	14,2					
20 *S_griseus*	15,5	14,8	14,4	16,2	14,9	15,3	15,7	18,4	17,2	14,7	17,6	15,5	18,2	15,2	15,3	15,6	14,6	15,2	17,1				
21 *S_collialei*	10,9	10,5	9,6	12,5	13,3	3,9	14,5	18,1	13,3	13,2	17,0	12,5	18,2	3,9	13,5	10,1	14,7	12,3	15,0	14,5			
22 *S_arizonensis*	12,7	12,5	14,8	12,3	14,4	12,2	6,3	16,2	15,0	13,5	16,7	14,1	15,8	11,9	15,1	14,1	13,5	0,6	14,0	15,0	11,8		
23 *A_rufa*	29,3	29,5	30,7	29,7	27,9	30,1	29,3	28,5	29,7	28,5	28,4	29,2	28,4	29,7	29,4	29,3	28,6	28,9	30,1	30,5	29,6	28,4	
	18,4	17,8	18,2	17,7	18,9	17,9	17,6	19,1	19	17,6	18,9	18,5	18,5	15,2	17	15,6	14,7	15,2	17,1	15	11,8		

Especie 1	Especie 2	%
S_granatensis_Col	*S_granatensis_GenBank*	7,5
S_aurogaster	*S_oculatus*	0,4
S_arizonensis	*S_nayaritensis*	0,6
S_collialei	*S_oculatus*	3,9
S_collialei	*S_aurogaster*	3,9
S_vulgaris	*S_lis*	4,6
S_arizonensis	*S_niger*	6,3
S_nayaritensis	*S_niger*	6,8

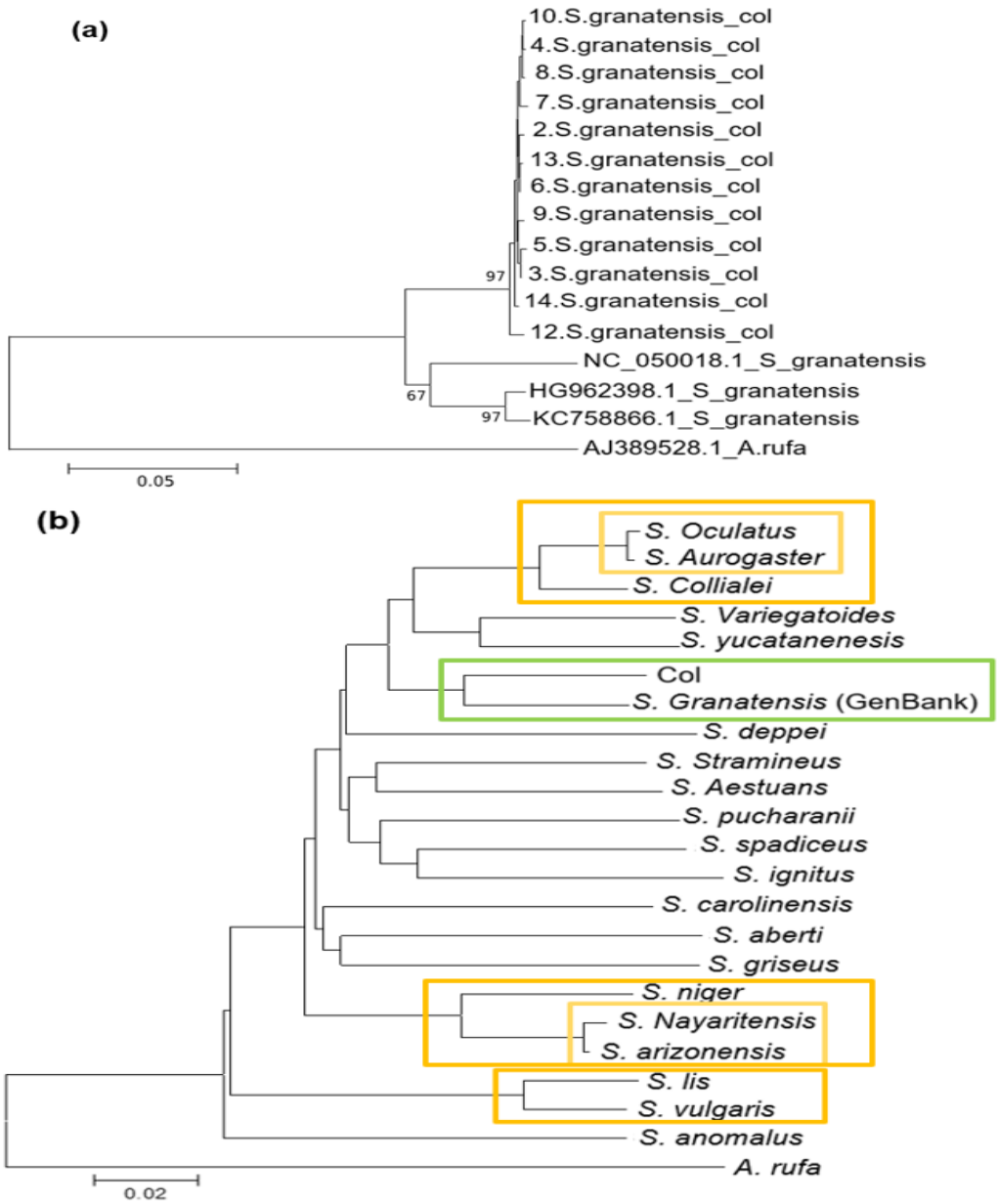

Figura 3. Árbol de Neiborg-Joinig usando distancia genética (a) intraespecífica, (b) interespecífica, calculado a partir del gen cyt b (1040 pb).

Análisis filogenético

El análisis de Máxima Verosimilitud (ML) usando las secuencias descargadas de GenBank (Tabla 2*)* y las secuencias colectadas para el presente estudio, mostró que *S. granatensis* es el grupo derivado más recientemente en relación a las especies analizadas en este estudio con el gen cyt b; sin embargo, se observa alguna divergencia de *S. granatensis* col (Santa Marta) con las *S.*

granatensis tomadas del GenBank. Así mismo, se puede observar el agrupamiento de todas las especies de origen neotropical, mostrándolas como clados hermanos y a aquellas especies distribuidas en Eurasia como un clado más ancestral (Figura 4).

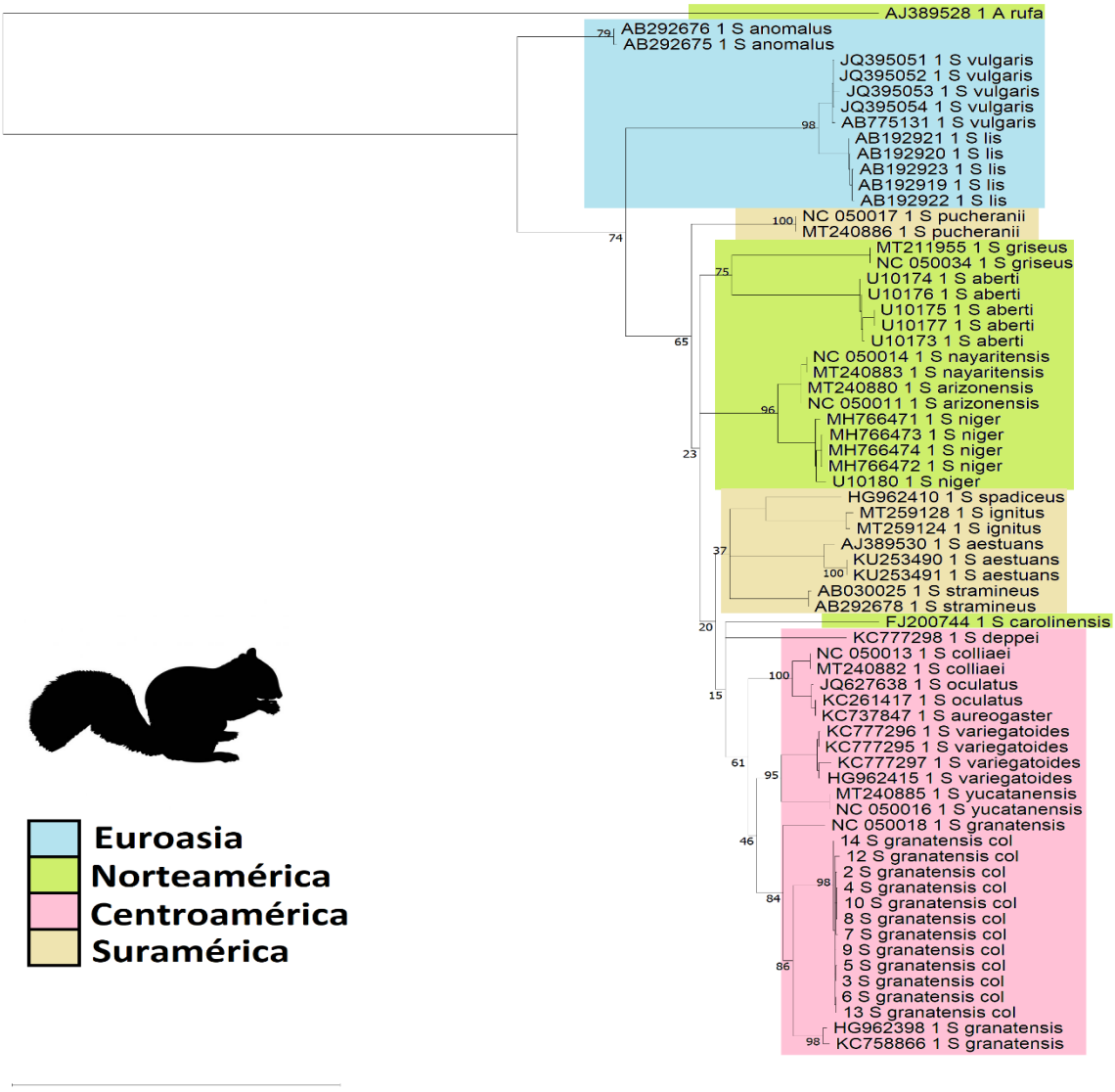

Figura 4. Árbol filogenético del género *Sciurus* usando el modelo ML calculado a partir del gen cyt b, el valor numérico representa el soporte de los nodos, los recuadros de colores señalan los continentes de origen.

En el análisis de inferencia bayesiana usando la misma matriz de secuencias del análisis anterior, mostró similitud con el resultado obtenido con ML, pero generando una mayor claridad en las relaciones filogenéticas de las especies de Norteamérica y Centroamérica, agrupando en un

mismo nodo a toda *S. granatensis*, pero separando a *S. granatensis* col de las demás; a su vez se observa en un mismo clado a todas las ardillas del género *Sciurus* originarias de Centroamérica (Figura 5).

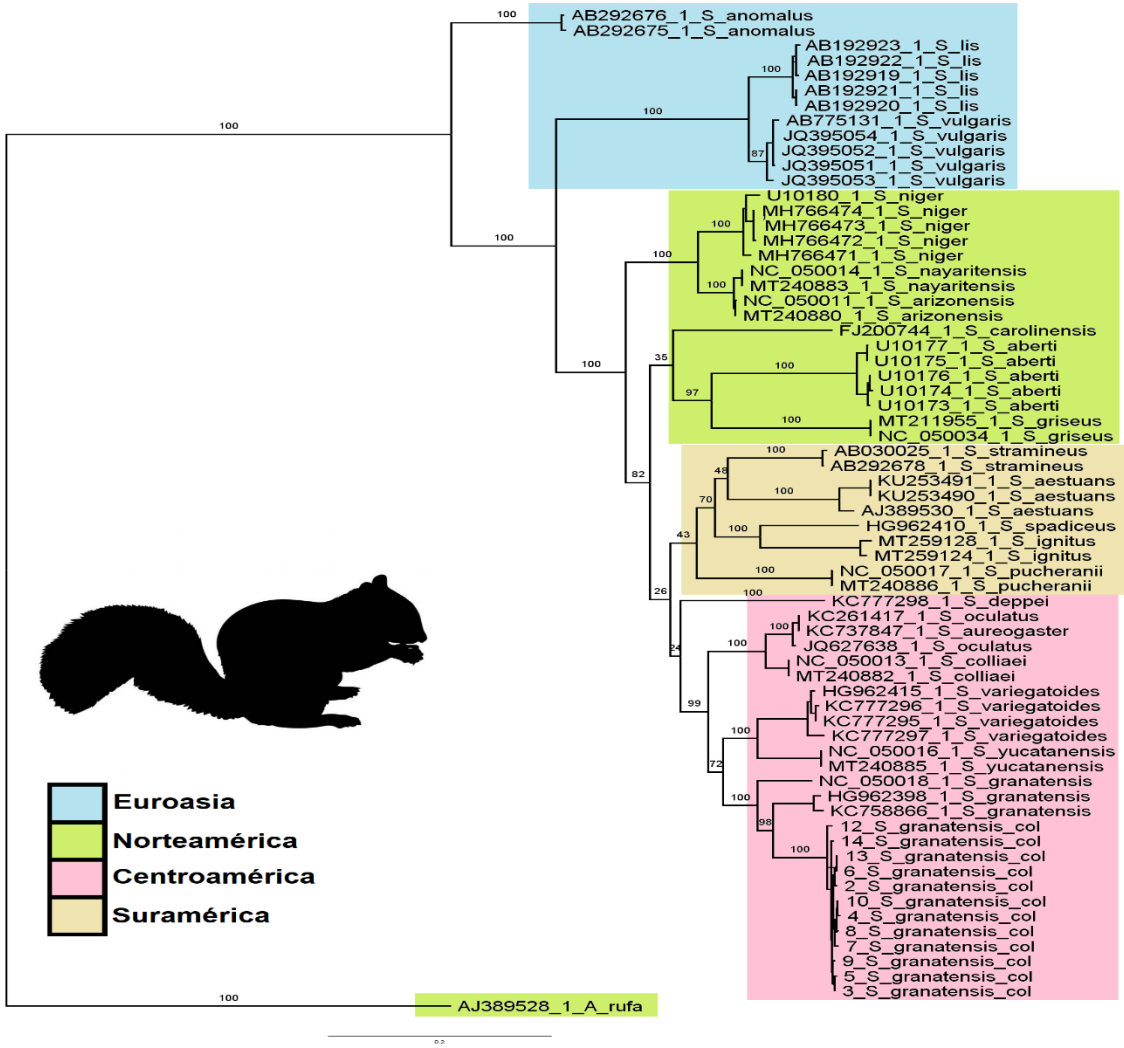

Figura 5. Árbol filogenético del género *Sciurus*, usando el modelo bayesiano calculado a partir del gen cyt b, los recuadros de colores señalan los continentes de origen.

Discusión

La familia Sciuridae es una de las más diversas dentro de los roedores, sin embargo, el discernimiento de las relaciones evolutivas entre los diferentes grupos de la familia resulta ser difícil (Thorintong et al., 2012). A diferencia de otros grupos de roedores, las ardillas presentan

un descuido referente a estudios filogenéticos que logren aclarar su organización (Abreu-Jr et al., 2020a). Las Ardillas arbóreas (Sciurinae: Sciurini) es uno de los grupos de mamíferos que más rápidamente se han diversificado (Roth y Mercer, 2008), no obstante, el escaso conjunto de datos taxonómicos, biogeográficos, el no incluir en su mayoría a las especies del Sur, Centro y Norte de América en los estudios previos, lleva a que se pueda incurrir en errores en inferencias filogenéticas y biogeográficas (Thorintong et al., 2012; Vivo y Carmignotto, 2015; Abreu-Jr et al., 2020b). Sumando a esto los factores intrínsecos de las especies como la plasticidad fenotípica, la variabilidad genética en los caracteres empleados para la identificación de especies, puede llevar a una tipificación errónea (Hebert et al., 2003). El código de barras de ADN, resulta ser una herramienta útil para despejar dudas en la identificación y organización taxonómica (Borisenko et al., 2008).

Nuestros resultados de distancia genética muestran coincidencia en la organización de los clados con respecto al lugar de origen de las diferentes especies del género *Sciurus* (Tabla 3); sin embargo, la distancia genética interespecífica nos muestra valores de divergencia muy bajos entre algunas especies previamente catalogadas como especies únicas/diferentes. A nivel intraespecífico, vemos valores altos de divergencia entre la especie *S. granatensis.*

Divergencia intraespecífica

Los valores de divergencia intraespecífica (Tabla 5) mostraron tres grupos (Figura 3a), donde las secuencias de la SNSM (*S. granatensis* col), presentan valores por debajo del 1%, señalando que no hay una gran variación entre ellas; mientras que se pudo observar que HG962398.1_*S-_granatensis* y KC758866.1_*S_granatensis* presentaron un porcentaje de distancia de 1.5%, lo que es consecuente debido a que estas dos secuencias fueron tomadas en la misma región (Tabla 4; Villalobos y Gutierres-Espeleta, 2014; Pečnerová et al., 2015). Sin embargo, también se observó que NC_050015.1_*S_granatensis* (registrada en Ecuador) con respecto a HG962398.1_*S_granatensis* y KC758866.1_*S_granatensis* (registradas en Centro América), presentan un porcentaje de divergencia entre el 7.9% y el 8%, a su vez NC_050015.1_*S_granatensis* y *S. granatensis* col, muestra un porcentaje de divergencia entre 9.3% - 9.7%. Al observar valores de divergencia mayores al 7% surge el cuestionamiento si estas secuencias realmente corresponden a una misma especie o si existe falta de concordancia en la identificación de esta especie y que antes no ha sido evaluada a una escala regional,

principalmente. Esto debido a que los resultados sugieren que a nivel local la variación es baja, mientras que los procesos de especiación y divergencia parecen ser más probable a nivel regional. Por ejemplo, Oshida y Masuda (2000) y Oshida et al. (2009) usando el gen cyt b reportan una divergencia intraespecífica menor a 1% en la mayoría de los casos (*S. lis, S. anomalus* y *S vulgaris*; Oshida et al 2009), exceptuando *S. vulgaris* con valores menores a 2.4 (Oshida y Masuda 2000). No obstante, sólo evalúa divergencia intraespecífica en estas especies, limitando el conocimiento de la variación en otras especies de *Sciurus*.

Divergencia interespecífica

El análisis de divergencia interespecífica mostró valores que fluctuaron entre 0.4% y el 6.8%, divergencia por debajo a la encontrada en este estudio para las secuencias de *S. granatensis* registradas en Colombia versus aquellas obtenidas del GenBank; pero llegando a valores menores de 19% en muchos casos. Por ejemplo, dos casos en particular son *S*. *aureogaste* y *S. oculatus* con 0.4%; *S. arizonensis* y *S. nayaritensis* 0.6% (Tabla 6), especies que se distribuyen en la misma área; así, *S. aureogaster* y *S. oculatus* proceden de Centro América (Monterrubio-Rico et al., 2013; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014) y *S. arizonensis* y *S. nayaritensis* proceden entre los límites de Estados Unidos y México (Abreu-Jr et al., 2020).

Los resultados encontrados en este estudio son consistentes con lo reportado por Oshida y Masuda (2000) y Oshida et al (2009) con esta misma región mitocondrial, mostrando divergencias de 4.9% (*S. lis* y *S. vulgaris*) a 21.3% (*S. vulgaris* y *S. averti;* Tabla 7; Oshida y Masuda, 2000) y 4.5% (*S. lis* y *S. vulgaris*) a 17.9% (*S. lis* y *S. aestuans;* Tabla 8; Oshida et al., 2009). Sin embargo, estos estudios sólo incluyeron seis y siete especies de Sciuridos, respectivamente; mientras que en el actual se usaron 21 especies, lo cual genera un espectro más amplio de relaciones evolutivas a partir de las cuales se puede realizar una inferencia más detallada.

Tabla 7. Comparación por pares de secuencias de nucleótidos del citocromo oxidasa b (1,040 pb) entre diez muestras de ardillas (Tomado y modificado de Oshida y Madusa, 2000).

	SAB	SCA	SNI	SST	SLI1	SLI2	SVU1	SVU2	SVU3	THU
SAB		18.3	19.8	18.7	20.4	19.8	20.3	20.1	21.3	23.2
SCA	136/27		14.7	16.3	19.0	20.0	19.6	19.2	20.6	21.9
SNI	145/29	106/30		15.5	19.5	19.1	18.2	18.0	19.5	22.1
SST	142/24	128/19	113/29		19.7	19.4	20.6	20.0	21.2	22.8
SLI1	131/50	128/49	122/53	128/48		0.8	6.2	5.4	6.8	21.0
SLI2	128/49	130/48	122/50	128/45	5/3		5.7	4.9	6.3	21.0
SVU1	132/48	126/49	116/49	140/42	51/10	49/7		1.3	2.4	22.2
SVU2	132/47	124/48	115/48	136/38	45/9	43/6	12/1		1.5	21.8
SVU3	134/54	130/53	120/55	139/48	49/18	47/15	14/10	6/9		23.0
THU	132/72	116/79	114/83	122/80	112/76	113/75	121/76	119/75	121/82	

Tabla 8. Comparación por pares de secuencias de nucleótidos del citocromo oxidasa b (1140 pb) entre dieciséis muestras de *Sciurus* (Tomado y modificado de Oshida et al., 2009).

	S. aestuans	*S. anomalus* 1, 2	*S. anomalus* 3	*S. anomalus* 4	*S. carolinensis*	*S. lis* 1	*S. lis* 2	*S. lis* 3	*S. lis* 4	*S. niger*	*S. stramineus*	*S. vulgaris* 1	*S. vulgaris* 2	*S. vulgaris* 3	*S. vulgaris* 4
S. aestuans		16.75	16.58	16.40	14.21	17.63	17.63	17.90	17.72	14.21	11.14	16.84	17.19	17.02	17.02
S. anomalus 1, 2	138/53		0.53	0.53	16.75	16.34	16.49	16.67	16.40	15.53	16.32	16.05	16.23	16.23	16.05
S. anomalus 3	136/53	4/2		0.70	15.70	16.05	16.23	16.40	16.14	15.26	16.14	16.00	16.14	16.14	16.00
S. anomalus 4	134/53	6/0	6/2		16.75	16.40	16.58	16.75	16.49	15.53	16.40	16.14	16.32	16.32	16.14
S. carolinensis	137/25	135/56	134/56	135/56		14.49	16.58	16.75	16.49	13.51	13.60	16.05	16.40	16.23	16.14
S. lis 1	146/55	130/56	129/54	131/56	130/58		0.26	0.35	0.26	14.49	16.05	4.47	4.56	4.65	4.47
S. lis 2	144/57	130/58	129/56	131/58	129/60	1/2		0.53	0.53	16.49	16.05	4.65	4.74	4.83	4.65
S. lis 3	144/58	131/59	130/57	132/59	130/61	1/3	1/5		0.61	16.75	16.32	4.83	4.91	5.00	4.83
S. lis 4	147/55	131/56	130/54	132/56	130/58	3/0	4/2	4/3		16.49	16.14	4.74	4.83	4.91	4.74
S. niger	129/33	119/58	116/58	119/58	116/38	134/54	132/56	134/57	134/54		12.90	15.53	15.70	15.70	15.61
S. stramineus	113/14	139/47	137/47	140/47	134/21	136/47	134/49	136/50	137/47	118/29		16.23	16.58	16.40	16.40
S. vulgaris 1	139/53	127/56	128/54	128/56	125/58	45/6	45/8	46/9	48/6	125/52	142/43		0.61	0.12	0.35
S. vulgaris 2	143/53	129/56	130/54	130/56	129/58	46/6	46/8	47/9	49/6	127/52	146/43	7/0		0.61	0.44
S. vulgaris 3	141/53	129/56	130/54	130/56	127/58	47/6	47/8	48/9	50/6	127/52	144/43	2/0	7/0		0.35
S. vulgaris 4	140/54	126/57	127/55	127/57	125/59	44/7	44/9	45/10	47/7	125/53	143/44	3/1	4/1	3/1	

Análisis filogenético

El análisis de inferencia bayesiana y Máxima Verosimilitud, confirman el agrupamiento y buen soporte de nodo en las secuencias de *S. granatensis* col obtenidas en la SNSM, sin embargo, este soporte se hace más débil en la rama que agrupa a *S. granatensis col* con KC758866_1_*S_granatensis*, HG962398_1_*S. granatensis* (Centro América) y NC_050018_1_*S_granatensis* (Ecuador), sugiriendo que la divergencia de esta especie se presenta a nivel regional más que a nivel local. El análisis de inferencia bayesiana (Figura 5) muestra un agrupamiento de las especies por región de origen, aunque el análisis de ML (Figura 4) agrupa a *S. deppei* (Centro América) *con S. carolinensis* (Norte América) y a *S. pucheranii* con las especies de Norte América, aunque el soporte de nodos para estos agrupamientos es muy bajo.

La organización filogenética de Abreu-Jr et al (2020), muestra semejanza con estos resultados, en la topología de su árbol, se siguen conservando las relaciones entre las especies del viejo mundo y se mantiene la agrupación de algunas especies similar a la de este estudio, como es el caso de la cercanía entre *S. griseus* y *S. aberti*; *S. arizonensis* con *S. nayaritensis*; *S, aureogaster* y *S. colliaei*; *S. yucatanensis* con *S. variegatoides* y *S. deppei*; *S. ignitus* y *S. spadiceus.*

Así mismo, las especies del viejo mundo (Tabla 3) *S. lis, S. vulgaris* y *S. anomalus* analizadas muestran concordancia con lo encontrado por Oshida et al (2009), donde se observa que estas tres especies no son monofiléticas, en ambos casos *S. lis y S. vulgaris* están estrechamente relacionadas, pero los resultados propuestos por estos autores señalan que *S. anomalus* se agrupa con las especies del Nuevo Mundo.

En el caso de *S. granatensis,* esta muestra una evolución temprana en los resultados y se ubica en las ramas más superiores del árbol, como es de esperarse por ser una de las especies con evolución más reciente en el grupo Sciurini. Esto es coherente con lo encontrado en otros estudios (Abreu-Jr et al 2020; Oshida et al 2009) donde describen una expansión gradual de la tribu Sciurini desde la región Paleartica, pasando por la región Neártica, hasta culminar con su mayor radiación en el Neotrópico; evidencia de esto es la posición basal de las especies Palearticas, quienes evolucionaron primero y colonizaron América del Norte a través del estrecho de Bering, mientras que un proceso de expansión más reciente se dio posterior a la aparición del Istmo de Panamá y posibilitó la colonización del Norte de Sur América, donde se ha dado la mayor radiación adaptativa del grupo.

Un estudio realizado por Abreu-Jr et al (2020) usando el mitogenoma extraído en muestras de 40 especies de ardillas arbóreas, con el fin de evaluar la filogenia del grupo y esclarecer la incertidumbre taxonómica de algunas especies, encuentran evidencia que indica una subestimación de la diversidad de ardillas arbóreas del Neotrópico y al menos seis taxones que deben ser revalidados, entre ellos *S. granatensis*, y proponen reasignar esta especie al género *Syntheosciurus*. Adicionalmente, evidencian la existencia de dos subclados: I) incluye especímenes de los Andes ecuatorianos y peruanos, Venezuela y Trinidad y Tobago; y II) incluye muestras de la costa de Ecuador, Colombia, Nicaragua y Panamá (Figura 6).

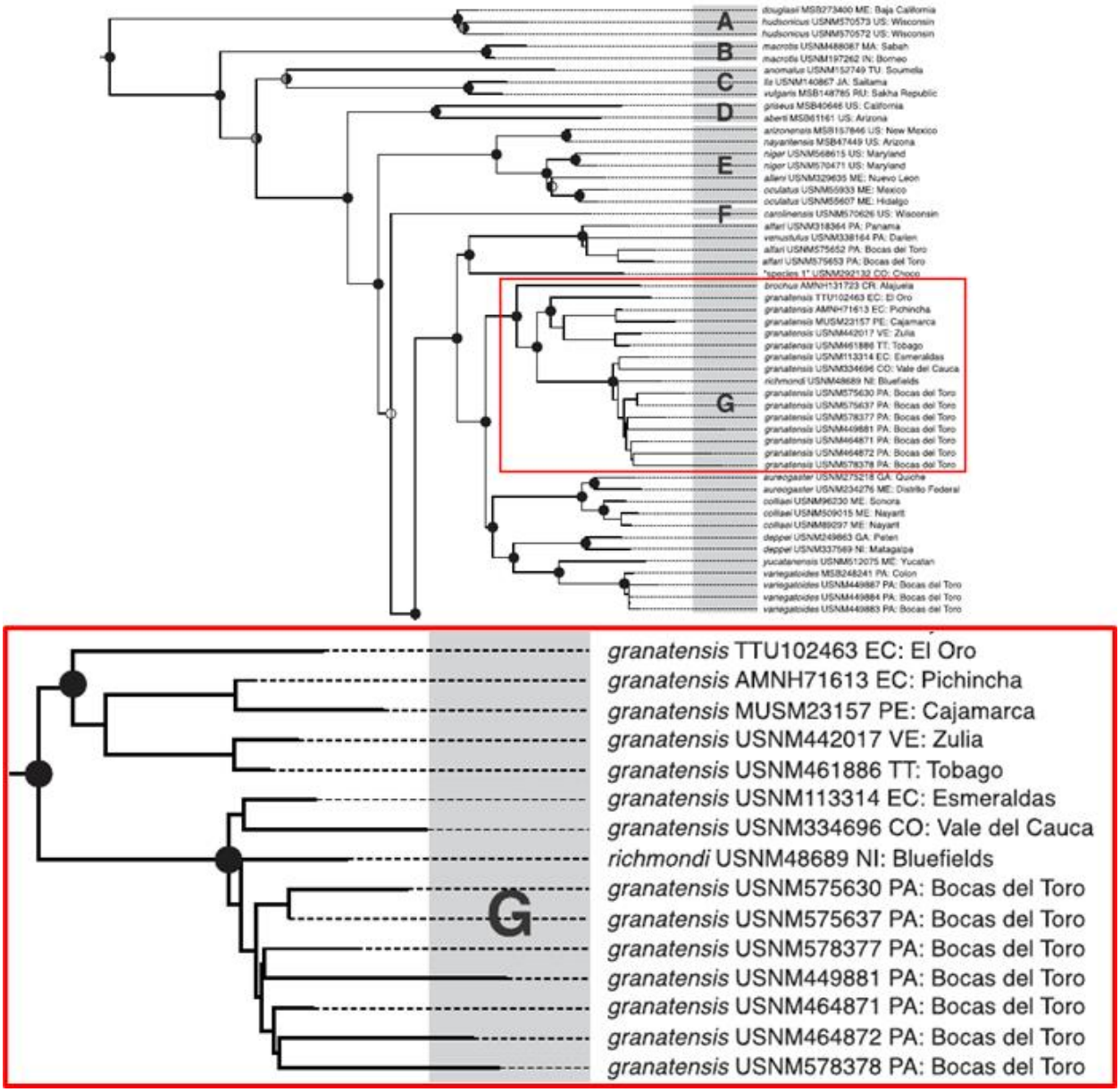

Figura 6. Inferencia filogenómica mitocondrial de Sciurini usando el modelo ML (tomado y modificado de Abreu-Jr et al., 2020a).

Los antecedentes previos y la moderada divergencia encontrada (>7.4% < 9.7%) para especímenes de *S. granatensis* en este trabajo, similar a la reportada a nivel interespecífico en otras especies, sugieren mayor atención para poder validar con completa claridad la identidad taxonómica de la especie. En ese sentido, Abreu-Jr et al (2020) sugieren revaluar esta especie debido a la falta de concordancia molecular y geográfica, dado que gran parte del material

examinado por estos autores provenía de museos y en algunos casos con hasta 120 años de antigüedad, y sólo una pequeña parte fue colectada del medio natural; situación que conlleva a incertidumbre por errores de identificación.

El panorama actual de la especie es un reto que demanda un diseño metodológico en el que se involucren colecta de material biológico en un área representativa de mayor diversidad genética de la especie; complementar datos moleculares con caracteres morfológicos bien definidos por especialistas, la inclusión de regiones nucleares que permitan contrastar la historia evolutiva y eviten caer en errores de árboles de genes en vez de árboles de que describan la historia evolutiva de la especie; por último, empezar a realizar trabajos a una jerarquía más poblacional que permitan detectar cambios en la variación genética y la estructura poblacional a una escala local. Esto ayudará no sólo a entender mejor la evolución de la especie, a definir o detectar subespecies o poblaciones, sino también a priorizar medidas apropiadas para aquellos individuos que requieran una mayor atención en términos de su conservación; atendiendo la preocupante situación que enfrenta la especie a causa de la reducción y deterioro desenfrenado de su hábitat por diversas actividades económicas y el insostenible crecimiento de la población mundial.

Conclusión

El uso del código de barras genético permitió confirmar que los ejemplares de *S. granatensis* colectados en las tres localidades de la SNSM para el presente estudio, son una misma especie y su diferencia en coloración de pelaje responde a plasticidad fenotípica.

La ardilla roja *S. granatensis* presenta una moderada divergencia entre las secuencias de la especie a nivel regional, lo que sugiere realizar estudios más detallados que permitan dar claridad a esta incertidumbre taxonómica.

Los Sciuridos de Centro y Sur América requieren de estudios más detallados que permitan establecer las relaciones filogenéticas y los procesos de evolución y colonización de estas áreas.

Recomendaciones

Es necesario incluir muestras de ejemplares de *S. granatensis* de todo el país para realizar futuras investigaciones y así vislumbrar claramente la organización taxonómica intraespecífica a nivel local.

Para futuras investigaciones, se sugiere incluir el uso de más de dos genes y de herramientas filogenéticas que permitan nutrir la información obtenida de los análisis de las secuencias.

Es necesario complementar los análisis moleculares con datos morfológicos para fortalecer los resultados encontrados.

Bibliografía

Abreu-Jr, F., Pavan, E., Tsuchiya, N., Wilson, E., Percequillo, R., Maldonado, E. (2020a). Museomics of tree squirrels: a dense taxon sampling of mitogenomes reveals hidden diversity, phenotypic convergence, and the need of a taxonomic overhaul. *BMC Evol Biol* 20**,** 77.

Abreu-Jr, F., Pavan, E., Tsuchiya, N., Wilson, E., Percequillo, R., Maldonado, E. (2020b). Spatiotemporal Diversification of tree Squirrels: ¿Is the South American Invasion and Speciation Really That Recent and Fast? *Front. Ecol. Evol.* 8:230.

Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T.S., Bandyopadhyay, T.K y Ghosh, P. (2017). Application of molecular markers in plant genoma análisis: a review. *Nucleus*, 60, 283-297.

Alberico, M., Cadena, A., Hernández-Camacho, J., y Muñoz-Saba, Y. (2000). Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. *Biota Colombiana*, *1*(1), 43-75.

Aljanabi, S., y Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, *25*(22), 4692-4693.

Arango, C., Bueno, M., y Chacón, M. (2007). Variación cariológica en diferentes fenotipos de *Sciurus granatensis* (Rodentia, Sciuridae). *Acta Biológica Colombiana*, *12*, 3-12.

Becerra, V., y Paredes, M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, *60*(3), 270-281.

Borisenko, V., Lim, K., Ivanova, V., Hanner, H y Hebert, N. (2008). DNA barcoding in surveys of small mammals communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources.* 8: 471-479.

Costa, L., Leite, Y., Mendes, S., y Ditchfield, A. (2005). Mammal Conservation in Brazil. *Conservation Biology*, *19*(3), 672-679.

Darriba, D., Taboada, GL., Doallo, R., y Posada, D. (2012). "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". Nature Methods 9(8), 772

De Abreu-Jr, F., Pavan, E., Tsuchiya, N., Wilson, E., Percequillo, R., Maldonado, E. (2020b). Spatiotemporal Diversification of tree Squirrels: Is the South American Invasion and Speciation Really That Recent and Fast? *Front. Ecol. Evol.* 8:230.

De la Herran, R., Robles, F., Martinez-Espin, E., Lorente, J.A., Rejón, C.R., Garrido-Ramos, M.A., Rejón, M.R. (2004). Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and ist implication for conservation. *Conservation Genetics*. 5: 545-551.

Emmons, L. (1990). *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide* (p. 307). University of Chicago Press.

FAO. (2010). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010* (p. 346). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Fike, J., Hennessy, C., Kennedy, M., y Rhodes, O. (2013). Eleven microsatellite markers for the eastern gray squirrel (Sciurus carolinensis) and their utility in eastern fox squirrels (Sciurus niger) and red squirrels (Tamiasciurus hudsonicus). *Conservation Genetics Resources*, *5*(3), 679-681.

Filatov, D. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, *25*(23), 3189-3190.

Gabrielli, M., Cardoso, Y., Benitez, V., Gozzi, A., Guichón, M., y Lizarralde, M. (2014). Genetic characterization of Callosciurus (Rodentia: Sciuridae) Asiatic squirrels introduced in Argentina. *Italian Journal Of Zoology*, *81*(3), 328-343.

Galetti, M., y Dirzo, R. (2013). Ecological and evolutionary consequences of living in a defaunated world. *Biological Conservation*, *163*, 1-6.

Garcés-Restrepo, M., y Saavedra-Rodríguez, C. (2013). Densidad de ardilla roja (S*ciurus granatensis*) en hábitats con diferentes coberturas vegetales en los Andes de Colombia. *Mastozoología Neotropical*, *20*(2), 381-386.

García-Herrera, L., Ramírez-Fráncel, L., y Reinoso Flórez, G. (2015). Mamíferos en relictos de bosque seco tropical del Tolima, Colombia. *Mastozoología Neotropical*, 22(1), 11-21.

García-Romero, H.G. (2013). Deforestación en Colombia: Retos y perspectivas. En: F. Dane (Ed.), *El Desafío del Desarrollo Sustentable en América Latina* (pp. 123-142). Rio de Janeiro: Konrad Adenauer Stiftung.

Granda-Rodríguez, H., Saboyá-Acosta, L., Portillo-Mozo, A., & Renjifo, J. (2014). Range extension of dendrobatid frog Colostethus ruthveni Kaplan, 1997 (Anura: Dendrobatidae) in the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Check List*, *10*(3), 674-676.

Guo, J., Wang, Z y Francis, F. (2017). Use of molecular markers for entomological diversity assessment and their application in population study of aphids. *Faunistic Entomology,* 70, 49-62.

Hardouin, E., Baltazar-Soares, M., Schilling, A., Butler, H., García-Rodríguez, O., y Crowley, E. et al. (2019). Conservation of genetic uniqueness in remainin populationsof red squirrels (Sciurus vulgaris L.) in the South of England. *Ecology And Evolution*, *9*, 6547-6558.

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., y deWaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313-321.

Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology And Evolution*, *33*(7), 1870-1874.

Lanfear, R., Frandsen, P., Wright, A., Senfeld, T., y Calcott, B. (2017). PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology And Evolution*, *34*(3), 772-773.

Luo, A., Zhang, A., Ho, S., Xu, W., Zhang, Y., & Shi, W. et al. (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *BMC Genomics*, *12*(84).

Mattey Trigueros, D., Navarro Picado, J., Obando Rodríguez, P., Fonseca Sánchez, A., y Núñez Solís, C. (2017). Caracterización de la cobertura vegetal dentro de la franja de protección del Río Copey, Jacó, Puntarenas, Costa Rica. *Revista Geográfica De América Central*, *1*(58), 275.

Mesa-S, L., Santamaría, M., García, H., y Aguilar-Cano, J. (2016). *Catálogo de biodiversidad de la región caribe. volumen 3. Serie Planeación ambiental para la conservación de la biodiversidad en áreas operativas de Ecopetrol. Proyecto Planeación ambiental para la conservación de la biodiversidad en las áreas operativas de Ecopetrol* (p. 452). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt – Ecopetrol S.A.

Monterrubio-Rico, T., Guido-Lemus, D., Charre-Medellín, J., Zabala-paramo, M., Padilla-Jacobo, G., Cano-Camacho, H., y Leon-Piniagua, L. (2013). Nuevo registro de la ardilla de Peters *Sciurus oculatus* (Peters 1863), para Michoacán y primera genotipificación molecular de la especie. *Acta Zoológica Méxicana*, *29*(2), 304-316.

Nitikman, L. (1985). Sciurus granatensis. *Mammalian Species*, (246), 1-8.

Oshida, T., Arslan, A., y Noda, M. (2009). Phylogenetic relationships among the Old Word *Sciurus* squirrels. *Folia Zool.*58(1): 14-25.

Oshida, T., Lin, L., Masuda, R., y Yoshida, M. (2000a). Phylogenetic Relationships among Asian species of Petaurista (Rodentia, Sciuridae), Inferred from Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences. *Zoological Science*, *17*(1), 123-128.

Oshida, T., y Masuda, R. (2000b). Phylogeny and Zoogeography of Six Squirrel Species of the Genus Sciurus (Mammalia, Rodentia), Inferred from Cytochrome b Gene Sequences. *Zoological Science*, *17*(3), 405-409.

Patton, J., Pardiñas, U., y D'Elía, G. (2015). Mammals of South America, Volume 2: Rodents (p. 1392). University of Chicago Press.

Paz, A., González, M., y Crawford, A. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, *16*(3), 161-175.

Pečnerová, P., Moravec, J., y Martínková, N. (2015). A Skull Might Lie: Modeling Ancestral Ranges and Diet from Genes and Shape of Tree Squirrels. *Systematic Biology*, *64*(6), 1074-1088.

Pilling, D., y Rischkowsky, B. (2010). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura (pp. 393-411). Roma: FAO.

Ramírez-Chaves, H., Suárez-Castro, A. y González-Maya, J. (2016). Cambios recientes a la lista de los mamíferos de Colombia. *Mammalogy Notes*, 3(1), 3-6.

Rangel-Ch, O., y Carvajal-Cogollo, E. (2012). *Clima de la región Caribe colombiana.* En: *Colombia Diversidad Biótica XII: La región Caribe de Colombia.* (pp. 67-129). Bogotá: Institutos de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia.

Rangel-Ch, O., y Garzón, A. (1995). *Sierra Nevada de Santa Marta -Colombia.* En: Rangel-Ch, O. (eds)*. Colombia Diversidad Biótica I* (pp. 155-170). Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional De Colombia.

Rangel-Negrín, A., Coyohua-Fuentes, A., Canales-Espinosa, D., y Dias, P. (2014). Mammal assemblages in forest fragments and landscapes occupied by black howler monkeys. *Primates*, *55*(3), 345-352.

Restrepo, I. C., Aldana, A.M., y Stevenson, P.R. (2016). Dinámica de bosques en diferentes escenarios de tala selectiva Enel Magdalena Medio (Colombia). *Colombia forestal*. 19(2), 71-83.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., y Höhna, S. et al. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539-542.

Roth, V., Mercel, J. (2008). Differing rates of macroevolutionary diversification in arboreal squirrels. *Current science.* (95)7: 857-861.

Solari, S., Muñoz-Saba, Y., Rodríguez-Mahecha, J., Defler, T., Ramírez-Chaves, H., y Trujillo, F. (2013). Riqueza, endemismo y conservación de los mamíferos de Colombia. *Mastozoología Neotropical*, *20*(2), 301-365.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688–2690.

Stanhope, M., Czelusniak, J., Si, J., Nickerson, J., & Goodman, M. (1992). A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, *1*(2), 148-160.

Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. (1994). Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Aligment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acid*s. Vol. 22 (22): 4673-4680

Thorington, R., Koprowski, J., Steele, M., y Whatton, J. (2012). *Squirrels of the World* (p. 459). Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Vera y Conde, C., y Rocha, C. (2006). Habitat disturbance and small mammal richness and diversity in an Atlantic rainforest area in southeastern Brazil. *Brazilian Journal Of Biology*, 66(4), 983-990.

Villalobos, F., y Cervantes, F. (2007). Phylogenetic relationships of Mesoamerican species of the genus Sciurus (Rodentia: Sciuridae). *Zootaxa*, *1525*(1), 31-40.

Villalobos, F., y Gutiérrez-Espeleta, G. (2014). Mesoamerican tree squirrels evolution (Rodentia: Sciuridae): a molecular phylogenetic analysis. *Revista De Biología Tropical*, *62*(2).

Villalobos, F., y Gutiérrez-Espeleta, G. (2014). Mesoamerican tree squirrels evolution (Rodentia: Sciuridae): a molecular phylogenetic analysis. *Revista De Biología Tropical*, *62*(2).

Vivo, M., y Carmignotto, A.P. (2015). “Family Sciuridae G Fisher, 1817”, en *Mammals of South America, Volume 2, Rodents*, eds J.L. Patton, U. F. J. Pardiñas, y G. D´Elía (Chicago, IL: The University of Chicago Press), 1-48.

Voss, R., y Emmons, L. (1996). *Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment* (pp. 27-56). New York: American Museum of Natural Hist